

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

HIGOR AZEVEDO ASSIS

**EFEITOS *IN VITRO* DA TRIIODOTIRONINA NA DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA
ÓSSEA DE RATAS**

ALEGRE-ES

2017

HIGOR AZEVEDO ASSIS

**EFEITOS *IN VITRO* DA TRIIODOTIRONINA NA DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA
ÓSSEA DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jankerle Neves Boeloni
Coorientador: Prof. Dr. Francisco de Paula Careta

ALEGRE-ES

2017

A848e Assis, Higor Azevedo, 1993
 Efeitos in vitro da triiodotironina na diferenciação condrogênica das
 células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas / Higor
 Azevedo Assis. – 2017.
 70 f. : il.

Orientador: Jankerle Neves Boeloni.

Coorientador: Francisco de Paula Careta.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Hormônios tireoidianos. 2. Medula óssea. 3. Triiodotironina.
I. Boeloni, Jankerle Neves. II. Careta, Francisco de Paula.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias. IV. Título.

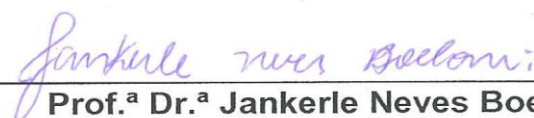
HIGOR AZEVEDO ASSIS

**EFEITOS *IN VITRO* DA TRIIODOTIRONINA NA DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA
ÓSSEA DE RATAS**

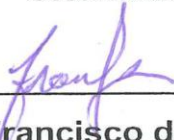
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovado em 20 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



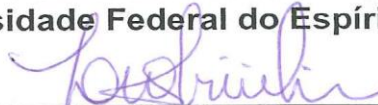
Prof.^a Dr.^a Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr. Francisco de Paula Careta
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador



Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Alvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
Universidade Federal do Espírito Santo

À toda minha família, principalmente à minha
mãe e avós.

AGRADECIMENTOS

Ao concluirmos uma etapa importante, se faz necessário agradecer a todos que estiverem ao nosso lado, pois sem apoio, amizade e amor, somos muito pequenos.

Primeiramente a Deus, que durante todo esse tempo iluminou meu caminho, me guardou e deu força, coragem e fé nos momentos de maior necessidade.

À minha família, em especial a minha mãe e avós, que sempre foram meu alicerce durante toda a vida, não existem palavras que possam agradecer a tudo que me proporcionaram, ajudaram e amaram, além de sempre me apoiarem em todas minhas escolhas.

À minha namorada, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, nunca medindo esforços para me ajudar no que fosse preciso e sempre compreendeu os momentos de minha ausência.

À toda equipe que trabalhou comigo durante esses dois anos, foram os responsáveis por tudo acontecer.

Agradeço ao professor Francisco de Paula Careta, meu coorientador e a professora Adriana Madeira Alvares da Silva, que além de todos os ensinamentos durante esse tempo também me proporcionaram o espaço e a oportunidade para que todo trabalho acontecesse.

À todos meus amigos que estiverem ao meu lado me estimulando, e que fizeram dessa jornada algo inesquecível.

Agradeço a minha orientadora, Jankerle, que além de toda paciência me acolheu e confiou para realização de tudo, foi muito mais que orientadora durante todo esse tempo, foi uma amiga e mentora.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade, a CAPES pela concessão da bolsa e a CNPq pelo financiamento do projeto.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

ASSIS, HIGOR AZEVEDO. **Efeitos *In Vitro* Da Triiodotironina Na Diferenciação Condrogênica Das Células-Tronco Mesenquimais Da Medula Óssea De Ratas.** 2017. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

As células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) são células com capacidade de diferenciação condrogênica e possuem receptores para os hormônios tireoidianos. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito *in vitro* da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas, durante vários períodos e em várias doses. CTM-MO de ratas Wistar que expressaram CD54, CD73 e CD90, foram cultivadas em meio condrogênico com ou sem T3 e separadas em cinco grupos: 1) CTM-MO sem T3; e 2,3,4,5) CTM-MO com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente). Aos sete, 14 e 21 dias avaliou-se: morfologia celular, formação de matriz condrogênica e expressão de Sox9 e colágeno II. Para as análises foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste post hoc de Dunn ou o teste de Student-Newman-Keuls. A dose de 100 nM não alterou os parâmetros avaliados em nenhum dos períodos estudados. No entanto, a dose de 0,01 nM T3 melhorou o potencial condrogênico por aumentar a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 e colágeno II em pelo menos um dos períodos avaliados; a dose de 1 nM T3 também melhorou o potencial condrogênico por aumentar a formação de matriz condrogênica e a expressão de colágeno II em pelo menos um dos períodos avaliados; e a dose de 1000 nM T3 estimulou precocemente a hipertrofia celular, porém melhorou o potencial condrogênico por aumentar a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 em pelo menos um dos períodos avaliados. Conclui-se que, a T3 tem efeito dose-dependente sobre a diferenciação das células-tronco mesenquimais de ratas, onde 0,01 nM T3 é a dose que apresenta o melhor efeito por aumentar a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 e colágeno II em pelo menos um dos períodos avaliados.

Palavras-chave: diferenciação condrogênica. hormônio tireoidiano. medula óssea

ABSTRACT

ASSIS, HIGOR AZEVEDO. **In Vitro Effects of Triiodothyronine on the Chondrogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.** 2017. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) are cells with chondrogenic differentiation capacity that have receptors for thyroid hormones. The aim of the present study was to verify the in vitro effect of triiodothyronine (T3) on the chondrogenic differentiation of female rat BMMSCs over several time periods and at several doses. CD54+/CD73+/CD90+ BMMSCs from Wistar female rats were cultured in chondrogenic medium with or without T3 and were separated into five groups: 1) BMMSCs without T3; 2) BMMSCs with 0.01 nM T3; 3) BMMSCs with 1 nM T3; 4) BMMSCs with 100 nM T3; and 5) BMMSCs with 1,000 nM T3. At seven, 14, and 21 days, the cell morphology, chondrogenic matrix formation, and expression of Sox9 and collagen II were evaluated. For the analyses, the Kruskal-Wallis test was used, followed by the Dunn post hoc test or the Student-Newman-Keuls test. The dose of 100 nM did not alter the parameters evaluated in any of the periods studied. However, the 0.01 nM T3 dose improved the chondrogenic potential by increasing the chondrogenic matrix formation and expression of Sox9 and collagen II in at least one of the evaluated periods; the 1 nM T3 dose also improved the chondrogenic potential by increasing the chondrogenic matrix formation and the expression of collagen II in at least one of the evaluated periods. The 1,000 nM T3 dose stimulated early cell hypertrophy but improved the chondrogenic potential by increasing the chondrogenic matrix formation and Sox9 expression in at least one of the evaluated periods. In conclusion, T3 has a dose-dependent effect on the differentiation of BMMSCs from female rats. Here, 0.01 nM T3 was the dose that presented the best effect by increasing the chondrogenic matrix formation and the expression of Sox9 and collagen II in at least one of the evaluated periods.

Key-words: chondrogenic differentiation. thyroid hormone. bone marrow

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 - Fluxograma demonstrando os procedimentos realizados ao longo de todo o período experimental. *HE: hematoxilina e eosina; PAS: ácido periódico de Schiff; qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	33
Figura 2 - Morfologia das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. HE, Barra = 52,55µm.....	40
Figura 3 - Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. HE, Barra = 52,55µm.....	42
Figura 4 - Produção de matriz condrogênica AB+ em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05.....	43
Figura 5 - Produção de matriz condrogênica PAS+ em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05.....	43
Figura 6 - Expressão relativa de Sox9 e colágeno II (Col II) (média ± desvio padrão em quadruplicata/grupo) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1;	

	100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, D), 14 (B, E) e 21 dias (C, F) de diferenciação condrogênica. *p<0,05.....	44
Figura 7 -	Expressão relativa de Sox9 (média ± desvio padrão em quadruplicata/grupo) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05.....	45
Figura 8 -	Expressão relativa de colágeno II (Col II) (média ± desvio padrão em quadruplicata/grupo) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05.....	46

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

ATDC – *Clonal mouse embryonal carcinoma cells*;

BMP – Proteínas morfogenéticas do osso;

BMP-2 – Proteína morfogenética do osso 2;

BMP-4 – Proteína morfogenética do osso 4;

BMP-6 – Proteína morfogenética do osso 6;

BMP-7 – Proteína morfogenética do osso 7;

BSA – Albumina do soro bovino;

CCAE – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da UFES;

CCENS – Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde;

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais;

Col II – Colágeno II;

Col10 – Colágeno X;

Col11 – Colágeno XI;

CT – Células-tronco;

CTA – Células-tronco adultas;

CTE – Células-tronco embrionárias;

CTM – Células-tronco mesenquimais;

CTM-MO – Células-tronco mesenquimais da medula óssea;

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*;

EGF – Fator de crescimento epidermal;

FACScan – *Fluorescence Activated Cell Analyser*;

FGF – Fator de crescimento fibroblástico;

FGF-2 – Fator de crescimento fibroblástico 2;

FGF-4 – Fator de crescimento fibroblástico-4;

FGFb – Fator de crescimento fibroblástico básico;

FL1 – Fluorescência relativa 1;

FSC – *Forward scatter*;

GAG – Glicosaminoglicanos;

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

GH – Hormônio do crescimento;

HE – Hematoxilina-eosina;

HT – Hormônio tireoidiano;

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina 1;

Ihh – *Indian hedgehog*;

IL-11 – Interleucina 11;

iPS – Células-tronco de pluripotência induzida;

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno;

MEC – Matriz extracelular;

MHC I – Complexo de histocompatibilidade principal de classe I;

MHC II – Complexo de histocompatibilidade principal de classe II;

PAS – Ácido periódico de Schiff;

PBS – Tampão de fosfato-salino;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

PTH – Paratormônio;

PTHrP – Peptídeo relacionado ao paratormônio;

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real;

Runx2 – *Runt-related trasnscription fator 2*;

SFB – Soro fetal bovino;

Shh – *Sonic hedgehog*;

SNK – *Student Newman Keuls*;

Sox9 – *SRY-related high mobility group-box gene 9*;

SSC – *Side scatter*;

SSEA-4 – Antígeno embrionário estágio-específico 4;

T3 – Triiodotironina;

TGF- β – Fator de crescimento transformador β ;

TGF- β 1 – Fatores de crescimento transformador β 1;

TGF- β 3 – Fatores de crescimento transformador β 3;

TNF- α – Fator de necrose tumoral α ;

TR – Receptor de hormônio tireoidiano;

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina;

TSH – Hormônio tireotrófico;

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo;

UFMG – Universidade federal de Minas Gerais;

ZNF145 – *Zinc-finger protein 145*;

α -MEM – *α -modified minimum essential medium*.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Hormônios tireoidianos.....	18
2.2 Células-tronco.....	19
2.3 Células-tronco mesenquimais.....	21
2.3.1 Células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	22
2.4 Diferenciação condrogênica.....	23
2.4.1 Diferenciação condrogênica <i>in vivo</i>	23
2.4.1.1 Tecido cartilaginoso.....	26
2.4.2 Diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	27
2.4.2.1 Efeito dos hormônios na diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Extração e cultivo de células-tronco mesenquimais em DMEM.....	33
3.2 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	34
3.3 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán.....	35
3.4 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	36
3.5 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica...	36
3.6 Expressão dos fatores de transcrição Sox9 e colágeno II por qPCR...	37
3.7 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	39
4.2 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán.....	39
4.3 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica...	39
4.3.1 Morfologia das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	39
4.3.2 Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+.....	41

4.4 Expressão dos fatores de transcrição Sox9 e Col II.....	43
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE.....	69

1. INTRODUÇÃO

As primeiras pesquisas relacionadas as células-tronco (CT) datam da década de 60 (FRIEDENSTEIN et al., 1968) e têm aumentado de forma extraordinária nos últimos anos, principalmente com relação à utilização das mesmas para o tratamento de diversas doenças incluindo as doenças ou defeitos cartilaginosos (KURODA et al., 2007; WAKITANI et al., 2007; RASTEGAR et al., 2010; NEJADNIK et al., 2010; WAKITANI et al., 2011; LIN; OTSU; NAKAUCHI, 2013; CHENG et al., 2014). O tecido cartilaginoso tem um potencial limitado de regeneração decorrente de propriedades intrínsecas como baixa vascularização e inervação (DANISOVIC; VARGA; POLÁKI, 2012). Dessa forma, terapias alternativas podem ser necessárias como o tratamento autólogo com condrócitos, porém esse método, muitas vezes, não oferece benefícios satisfatórios para o paciente (BREINAN et al., 1997; LEE et al., 2000). Assim, a utilização de uma terapia celular alternativa com CT pode ser empregada (WAKITANI et al., 2007; CHENG et al., 2014).

As células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) podem se diferenciar em condrócitos, osteoblastos, adipócitos, tenócitos e miócitos (PAYUSHINA, DOMARATSKAYA, STAROSTIN, 2006). Especificamente sobre a diferenciação condrogênica de CTM-MO, já existem protocolos bem definidos (SOLCHAGA et al., 2011;). No entanto, muitos fatores e mecanismos ainda precisam ser elucidados, principalmente com relação ao aumento do potencial condrogênico dessas células.

Nesse contexto, os principais fatores hormonais genéticos e de crescimento que influenciam na diferenciação *in vitro* das CTM-MO na linhagem condrogênica têm sido pesquisados. Assim, fatores de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (BARRY et al., 2001), $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) (BARRY et al., 2001; SHEN et al., 2009; PARK et al., 2011; HARA et al., 2016), fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) (SOLCHAGA et al., 2010), proteína morfogenética do osso 2 (BMP-2) (SEKIYA et al., 2005; SHEN et al., 2009), 4 (BMP-4) (SEKIYA et al., 2005), 6 (BMP-6) (SEKIYA; COLTER; PROCKOP, 2001; SEKIYA et al., 2005), 7 (BMP-7) (SHEN et al., 2010), insulina (HARA et al., 2016), genes como Sox5, Sox6 e Sox9 (PARK et al., 2011), paratormônio (PTH) (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014) e a dexametasona

(DERFOUL et al., 2006) são fatores importantes para a diferenciação condrogênica de CTM-MO.

Adicionalmente, tem-se o conhecimento que os hormônios tireoidianos influenciam *in vivo* o crescimento ósseo, pois regulam os processos de diferenciação e maturação dos condrócitos da zona hipertrófica ou de maturação da placa epifisária (ROBSON et al., 2000). Além disso, *in vivo*, as CTM se diferenciam em condroblastos para formar o modelo cartilaginoso responsável pela formação óssea endocondral que ocorre na maioria dos ossos do esqueleto (LEFEBVRE; BHATTARAM, 2010) e é sabido ainda que os hormônios tireoidianos estimulam o crescimento e a maturação *in vitro* do tecido cartilaginoso embrionário (BURCH; LEBOVITZ, 1982). Em cultura de tíbias de ratos, os hormônios tireoidianos estimulam o crescimento dos condrócitos da placa epifisária, principalmente da zona hipertrófica (MIURA et al., 2002), em culturas de condrócitos e de ATDC cells (clonal mouse embryonal carcinoma cells) estimulam a hipertrofia dessas células (ROBSON et al., 2000; SIEBLER et al., 2002; OKUBO; REDDI, 2003; MUELLER; TUAN, 2008) e em cultura de CTM-MO de humanos, a triiodotironina (T3) mediada pela BMP-4 estimula a hipertrofia dessas células (KARL et al., 2014).

Estudos prévios demonstram que os hormônios tireoidianos podem influenciar positivamente na diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM-MO de ratas jovens, de forma dose-dependente (BOELONI et al., 2009). No entanto, o tratamento *in vitro* com T3 apresenta efeitos negativos sobre fatores envolvidos na diferenciação osteogênica de CTM-MO de ratas adultas (BOELONI et al., 2013b). Mas, não se sabe se o tratamento *in vitro* com T3 poderia aumentar também o potencial condrogênico das CTM-MO de ratas. O que se sabe é as CTM-MO apresentam receptores nucleares para hormônios tireoidianos (GRUBER et al., 1999; SIDDIQI et al., 2002). Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito *in vitro* da T3 na diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas, durante vários períodos e em várias doses.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 Hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos (HT), tiroxina (T4) e seu derivado triiodotironina (T3), são compostos iodados responsáveis pela essencial influência no crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos nos vertebrados. A ação desses hormônios se inicia já durante a embriogênese e persiste durante toda a vida adulta, visto que alguns órgãos influenciados pela ação dos HT ainda são imaturos ao nascimento. Além disso, a T3 desempenha papel vital na regulação do organismo como um todo (NUNES, 2003; BIANCO; KIM, 2006).

A função da glândula tireoide é regulada pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que através do sistema porta hipotálamo-hipofisário se destina a porção anterior da hipófise, conhecida como adeno-hipófise, ligando-se a receptores específicos no tireotrofo, induzindo a secreção do hormônio tireotrófico (TSH) (GREENSPAN; RESNICK, 1997). O TSH induz alterações morfológicas e funcionais nas células foliculares da glândula tireoide, resultando em hipertrofia e hiperplasia das membranas, estímulo a síntese de tireoglobulinas e estímulo a síntese de proteínas chaves envolvidas na síntese e secreção dos HT (OBREGON; DEL REY; DE ESCOBAR, 2005).

A glândula tireoide é responsável pela produção dos HT, secretando predominantemente T4, da qual por ação de enzimas tem sua desiodação em T3, hormônio que apresenta atividade biológica no mínimo cinco vezes maior que a do T4. A T3 tem atividade em praticamente todos os tecidos do organismo, visto que estes possuem potencial para expressão de receptores específicos aos HT (NUNES, 2003).

A conversão do T4 em sua forma ativa nos tecidos, T3, é realizada pela ação de enzimas denominadas desiodases, que são as principais conversoras da T3 circulante e intracelular. São conhecidas três isoformas de desiodases, tipo I (D1), II (D2) e III (D3). Além disso, as desiodases tem papel importante na regulação na via de sinalização dos HT (BIANCO; KIM, 2006).

A D1 é importante principalmente em fígado e rins, tem seu efeito aumentado no hipertireoidismo e diminuído no hipotireoidismo (CHOPRA, 1977). Por sua vez a

D2 encontrada no sistema nervoso central, hipófise, tecido adiposo marrom e placenta, tem seu efeito diminuído no hipertireoidismo e aumentado no hipotireoidismo (KÖHRLE, 1999). A D3 assim como a D1 tem sua ação elevada em casos de hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo, é encontrada principalmente em tecidos em desenvolvimento, produz apenas formas inativas dos HT e é responsável pela modulação e controle dos efeitos dos HT (NUNES, 2003).

Uma vez que os níveis dos HT adequados são garantidos pela ação das desidases, as ações biológicas desses hormônios passam a depender de sua interação com receptores específicos, os receptores tireoideanos (TR) que se localizam no núcleo das células-alvo (NUNES, 2003).

Os TR são expressos por dois genes localizados no cromossomo 17 e 3, sendo denominados TR α e β , por *splicing* alternativo, cada um gene gera duas isoformas TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2. Sendo formados por três domínios, (1) domínio independente de ligante, (2) domínio de ligação ao DNA e (3) domínio de ligação ao ligante T3. O TR α 2 não possui domínio de ligação ao T3, dessa forma sua expressão em dado tecido tem por objetivo impedir a ação do T3 (NUNES, 2003).

Dessa forma o T3 exerce seus efeitos biológicos devido a inibição ou ativação da expressão de genes-alvo, que implica na produção ou não de proteínas específicas, ações essas que são intermediadas pela interação com seus receptores nucleares (BIANCO; KIM, 2006). Como exemplos específicos de genes-alvo tem-se: GH (hormônio do crescimento), SERCA I e II (isoformas I e II da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático), do receptor beta adrenérgico, do NGF (fator de crescimento neuronal), do TSH, do TRH, entre outros (NUNES, 2003).

Os HT também participam em diversas ações não genômicas que foram descobertas recentemente como coordenação do crescimento e metabolismo, regulação dos canais iônicos e fosforilação oxidativa (VAITKUS; FARRAR; CELI, 2015).

2.2 Células-tronco

As pesquisas com células-tronco têm sido exploradas de forma crescente nos últimos anos, devido as inúmeras possibilidades que essas células oferecem em

terapias teciduais e celulares, principalmente pelo fato de poderem ser a cura para uma grande variedade de doenças que não possuem tratamento eficaz, ou ainda, auxiliando em casos onde apenas o tratamento farmacológico não é suficiente (RANGANATH et al., 2012). No entanto, a forma de utilização dessas células e seus mecanismos de diferenciação, são assuntos que ainda possuem perguntas a serem respondidas (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005; LIN; OTSU; NAKAUCHI, 2013). Nesse contexto, muitos estudos ainda precisam ser desenvolvidos com o intuito de responder esses questionamentos.

As CT são populações de células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e de se diferenciarem em diversos tipos celulares (LEMISCHKA, 2005). Assim, as CT são capazes de permanecerem em seu estado indiferenciado por longos períodos, mantendo-se dessa forma para quando necessário substituírem ou renovar uma linhagem celular (unipotentes), múltiplas linhagens celulares (multipotentes) ou até mesmo em células dos três folhetos germinativos (pluripotentes): ectoderma, mesoderma e endoderma (RASTEGAR et al., 2010).

As CT podem ser classificadas de acordo com seu local de origem em: 1) células-tronco embrionárias (CTE), que são derivadas do embrião na fase de blastocisto, sendo consideradas como pluripotentes ou multipotentes e com capacidade de se diferenciarem em células dos três folhetos embrionários (WAGERS; WEISMAN, 2004); 2) células-tronco adultas (CTA) oriundas tanto do feto quanto de indivíduos adultos, que são multipotentes, ou seja, são mais diferenciadas que as CTE e com capacidade de dar origem a um grupo mais limitado de células (GAGE, 2000; SHENFIELD et al., 2002; CSAKI et al., 2007); 3) células-tronco de pluripotência induzida (iPS), são obtidas a partir de modificação gênica de fibroblastos, onde são reprogramadas por mecanismos de transfecção celular com vetores lentivirais contendo fatores de transcrição como Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, assumindo assim características de CTE (TAKAHASHI et al., 2007).

Com a relação à medicina regenerativa usando células-tronco, tanto as CTA quanto as CTE podem se apresentar como alternativas promissoras, no entanto, devido as particularidades de cada grupo de células elas apresentam vantagens e desvantagens quando comparadas. Apesar de sua pluripotencialidade ser uma vantagem, o uso das CTE pode acarretar riscos, como a proliferação exagerada das células, causando assim o aparecimento de neoplasias como o teratoma (SHENFIELD et al., 2002).

Além disso, existem questões legais, éticas e religiosas que dificultam a utilização de CTE em terapias ou até mesmo pesquisas. Questões essas que não se aplicam as CTA, tornando-as uma alternativa viável (BYDLOWSKI et al., 2009). Outras vantagens das CTA é que as mesmas estão presentes em diferentes tecidos e possuem importante papel regenerativo e respondem de forma reparadora quando o órgão sofre algum tipo de agressão, lesão ou injúria (LEMISCHKA, 2005; CAPLAN, 2009). Além disso, as CTA são disponíveis nos indivíduos adultos, o que por sua vez torna possível sua coleta seguida de expansão *ex vivo* e reintrodução no paciente, chamado autotransplante, eliminando assim qualquer risco de rejeição pelo sistema imune (JAVAZON; BEGGS; FLAKE, 2004). A desvantagem das CTA é que com o avançar da idade do paciente sua capacidade proliferativa e de diferenciação diminuem (KRETLOW et al., 2008; ZHANG et al., 2008; BOELONI et al., 2013a), reduzindo a chances de sucesso no tratamento de algumas doenças, principalmente as doenças senis (BYDLOWSKI et al., 2009).

2.3 Células-tronco mesenquimais

As CTM são exemplos de CTA e podem ser isoladas de variados tecidos, tanto de origem animal quanto de origem humana, incluindo cérebro (UCHIDA et al., 2000), tecido adiposo (ZUK et al., 2002), sangue do cordão umbilical (WANG et al., 2014), polpa dentária (GRONTHOS et al., 2011; CASAGRANDE et al., 2011), líquido amniótico (NARAKORNSAK et al., 2016); região periodontal (LAINO et al., 2005), intestino (BJERKNES; CHENG, 2006), retina (COLES et al., 2004), periósteo (RINGE et al., 2008), músculos (LIU et al., 2015), membrana e líquido sinovial (PRADO et al., 2015), placenta (MENG et al., 2007), tegumento (SELLHEYER; KRAHL, 2010) e medula óssea (MINGUELL et al., 2000; JIANG et al., 2002).

De forma geral, todas as CTM expressam marcadores de células embrionárias como Oct-4, Nanog e antígeno embrionário estágio-específico 4 (SSEA-4) (GANG et al., 2007). As CTM expressam ainda CD105 (SH2), CD90 (Thy-1), CD71 (LIU; ZHUGE; VELAZQUEZ, 2009), CD44 (PITTENGER et al., 1999), CD166 (STEWART et al., 2003; JONES et al., 2006), Stro-1 (SIMMONS et al., 1991; KOLF; CHO; TUAN, 2007), CD106 (PITTENGER et al., 1999; GRONTHOS et al., 2003) e CD146 (GRONTHOS et al., 2003; JONES et al., 2006).

As CTM podem ser cultivadas *in vitro* em monocamada e em condições ideais (37°C e 5% CO₂) (JACKSON et al., 2007). Utilizam-se meios básicos como *α-modified minimum essential medium* (α-MEM) ou *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (SOTIROPOULOU et al., 2006; BARLOW et al., 2008; BARA et al., 2014) acrescidos de 10% soro fetal bovino (SFB) que, por sua vez, estimula a proliferação celular (BARLOW et al., 2008; BARA et al., 2014). Além disso, existem fatores de crescimento como FGF-2 (DI MAGGIO et al., 2012), fator de crescimento fibroblástico-4 (FGF-4) e fator de crescimento epidermal (EGF) que também estimulam a proliferação de CTM (KRATCHMAROVA et al., 2005; TAMAMA; KAWASAKI; WELLS, 2010).

As CTM apresentam uma diminuição na capacidade proliferativa ao longo do cultivo *in vitro* podendo entrar em senescência celular (BRUDER; JAISWAL; HAYNESWORTH, 1997; BANFI et al., 2000; BONAB et al., 2006). Dessa forma, sugere-se que as mesmas podem ser cultivadas por 8 a 15 passagens, correspondendo a aproximadamente 25-40 duplicações e 80-120 dias de cultivo (BANFI et al., 2000; MURAGLIA; CANCELEDDA; QUARTO, 2000; BARLOW et al., 2008).

As CTM apresentam ainda características imunológicas pois expressam complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) e não expressam histocompatibilidade principal de classe II (MHC II), CD40, CD80 e CD86 sendo definidas como células não imunogênicas (JAVAZON; BEGGS; FLAKE, 2004).

2.3.1 Células-tronco mesenquimais da medula óssea

A medula óssea, especificamente, é um dos principais sítios doadores de CTM devido a facilidade de isolamento e expansão *in vitro* (MINGUELL et al., 2000; RASTEGAR et al., 2010). No entanto, somente uma pequena fração de CTM é isolada durante a coleta correspondendo a cerca de 0,0001 a 0,01% do total de células da medula óssea (PITTENGER et al., 1999). Mas, devido a facilidade de expansão e diferenciação *ex vivo*, essas células são consideradas excelentes fontes para a terapia celular (MINGUELL et al., 2000; RASTEGAR et al., 2010).

Em 1867 o patologista alemão Julius Clonheim foi pioneiro ao sugerir que havia a presença de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea de

camundongos, e que essas células seriam fontes de fibroblastos para os processos fisiológicos de reparo (BYDLOWSKI et al., 2009). No entanto, foram Friedenstein e colaboradores (1968) que comprovaram as hipóteses de Julius Clonheim ao descreverem a existência das CTM-MO, pelo cultivo de células da medula óssea de coelhos, que apresentavam forma fibroblastoide e possuíam a capacidade de se aderirem a superfície plástica. Inicialmente foram denominadas unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-fs), devido sua semelhança com fibroblastos e o fato de que cada colônia era derivada de uma única célula precursora (FRIEDENSTEIN et al., 1968, 1970, 1976). Desde então o interesse em pesquisas usando essas células se tornou muito frequente, tanto com relação ao isolamento, quanto diferenciação e uso em terapias clínicas (BYDLOWSKI et al., 2009; BARA et al., 2014; HOCH; LEACH, 2014).

As CTM-MO são também chamadas de células do estroma da medula óssea, células-tronco estromais da medula óssea, células precursoras do estroma, células-tronco esqueléticas e células progenitoras adultas, porém o nome mais utilizado é CTM-MO (CHEN et al., 2008).

Apesar das CTM-MO não apresentarem características exclusivas a elas a “*International Society for Cellular Therapy*” definiu critérios para sua caracterização como: (1) apresentarem capacidade de adesão em superfícies plásticas em cultura; (2) expressarem CD73, CD90 e CD105 e não expressarem CD14 (CD11b), CD34, CD45 e CD79 (CD19) em mais de 95% das células em cultura; e (3) possuem capacidade de se diferenciarem em tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo (DOMINICI et al., 2006).

2.4 Diferenciação condrogênica

2.4.1 Diferenciação condrogênica *in vivo*

A diferenciação de células mesenquimais em condrócitos ocorre em várias etapas e é caracterizada por uma complexa cascata de ativação e inativação gênica (LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001).

As etapas da condrogênese incluem: (a) recrutamento de células

mesenquimais condroprogenitoras; (b) subsequente condensação dessas células (DE CROMBRUGGHE et al., 2000; DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001), onde as células iniciam a expressão de moléculas de adesão, como por exemplo, a N-caderina (DELISE; TUAN, 2002), além da expressão de fibronectina que, por sua vez, é regulada pelo TGF- β (ROARK; GREER, 1994); (c) após a condensação ocorre a diferenciação em condrócitos, que neste estágio estão circundados com uma abundante camada de matriz extracelular (MEC) que é característico da cartilagem. Estes condrócitos sofrem proliferação formando colunas paralelas de forma unidirecional, sendo essa forma de crescimento responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos. Em seguida, tornam-se condrócitos pré-hipertróficos e depois condrócitos hipertróficos que posteriormente entram em apoptose (DE CROMBRUGGHE et al., 2000; DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001).

Ao mesmo tempo que as células mesenquimais condroprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, ocorre a invasão de vasos sanguíneos e osteoclastos na zona hipertrófica. Assim, os osteoclastos degradam a matriz da zona hipertrófica e os osteoblastos produzem osteoide (DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001).

Os componentes da MEC têm um papel importante na modulação e manutenção do fenótipo dos condrócitos e sua correta organização na placa de crescimento (MUNDLOS; OLSEN, 1997ab).

Alguns fatores são conhecidos por influenciar as etapas da diferenciação condrogênica (ERLEBACHER et al., 1995; MUNDLOS; OLSEN, 1997ab) como Sox5, Sox6, Sox9 (LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998; LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001), BMP, fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) (DE CROMBRUGGHE et al., 2000; LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001), *Indian hedgehog* (Ihh), peptídio relacionado ao paratormônio (PTHrP) (DE CROMBRUGGHE et al., 2000), entre outros. Esses peptídeos exercem seus efeitos pelo desencadeamento de vias de sinalização intracelular e sua ação pode ser controlada tanto de forma intracelular quanto extracelular (DE CROMBRUGGHE et al., 2000).

Sox5, Sox6 e Sox9 são coexpressos durante toda a condrogênese (NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997; KOCH et al., 2000). Sendo que os três Sox são expressos em todas as células condroprogenitoras de embriões, em altos níveis em

condrócitos e não são expressos em condrócitos hipertróficos (WRIGHT et al., 1995; NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997; LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998). Além disso, são capazes de ativar genes como colágeno II (Col2a1) e agregan (WRIGHT et al., 1995; NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997; LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998; KOCH et al., 2000). Especificamente o Sox9 é essencial para a condensação celular (DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001). Assim, fica exposto que os três Sox são importantes para a condrogênese *in vivo* (LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998; LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001; LEFEBVRE; BHATTARAM, 2016).

A expressão de Sox9 é controlada por alguns fatores como BMP-2, BMP-4 e *Sonic hedgehog* (Shh) que induzem e mantem a expressão desse gene (MURTAUGH; CHYUNG; LASSAR, 1999; ZEHENTNER; DONY; BURTSCHER, 1999; SEMBA et al., 2000). O FGF também aumenta a expressão de Sox9 tanto em condrócitos quanto em células mesenquimais indiferenciadas mediado via proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (MURAKAMI et al., 2000). Além disso, os hormônios tireoidianos inibem a ação do Sox9, a fim de promover a hipertrofia dos condrócitos (OKUBO; REDDI, 2003).

O colágeno II, por sua vez, também é expresso em todas as células condroprogenitoras e em altos níveis em condrócitos (CHEAH et al., 1991) e gradativamente essa expressão vai sendo substituída pela expressão de colágeno X (Col10a1) (LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001). Assim como o colágeno II, o colágeno XI (Col11a2) também é expresso em alto níveis em condrócitos (DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001).

O PTHrP é expresso em altos níveis em condrócitos pré-hipertróficos e em baixos níveis em condrócitos (HUANG et al., 2000) e tem a função de inibir a transição de condrócitos pré-hipertróficos em hipertróficos (KARAPLIS et al., 1994). Além disso, o PTHrP aumenta a atividade transcricional de Sox9 (WATANABE; YAMADA, 1999). O Ihh também tem o papel de controlar a diferenciação de condrócitos pré-hipertróficos em hipertróficos, mas tem ação sobre as células que não estão inibidas pelo PTHrP (VORTKAMP et al., 1996).

2.4.1.1 Tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso desempenha várias funções importantes nos organismos vivos. São responsáveis pelo suporte aos tecidos moles, reveste as superfícies articulares onde fazem a absorção de choques mecânicos e promovem o deslizamento entre os ossos, além de possuir papel fundamental na ossificação durante a vida fetal e após o nascimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O tecido cartilaginoso é composto por células especializadas, os condrócitos, e material extracelular produzido por essas células, denominado matriz cartilaginosa. De forma geral, essa matriz é constituída por fibras de colágeno (I, II e X), sendo o II o mais abundante (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA et al., 2011), macromoléculas de proteoglicanos (BARRY et al., 2001; SOLCHAGA et al., 2011), glicosaminoglicanos (GAG) (BARRY et al., 2001), ácido hialurônico, diversas glicoproteínas e elastina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Três tipos de cartilagem podem ser discriminados com relação a matriz formada: hialina, elástica e fibrosa (MOORE; PERSAUD, 2008).

A cartilagem hialina é a mais abundante nos mamíferos, é responsável pelo primeiro molde que dará forma ao esqueleto ósseo e compõe o disco epifisário responsável pelo crescimento dos ossos longos após o nascimento. Pode ser encontrada também em fossas nasais, brônquios, traqueia e extremidades das costelas (GARTNER; HIATT, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A matriz da cartilagem hialina é composta por fibras colágenas tipo II em associação ao ácido hialurônico, proteoglicanos hidratados e glicoproteínas. Toda cartilagem hialina, exceto as cartilagens articulares, são revestidas por uma camada de tecido denso, denominado pericôndrio, que é responsável pela oxigenação, nutrição e eliminação de metabólitos. A cartilagem presente nas articulações se nutre por meio do líquido sinovial (MOORE; PERSAUD, 2008).

O crescimento da cartilagem se dá de duas formas: (a) crescimento intersticial, por divisão mitótica dos condrócitos já preexistentes, sendo que esse tipo de crescimento só ocorre nas primeiras fases da vida; e (b) crescimento aposicional, que se faz a partir das células do pericôndrio e é a forma de crescimento mais comum na cartilagem hialina (TORTORA; DERRICKSON, 2008).

A cartilagem elástica é encontrada em tuba auditiva, epiglote, laringe e no pavilhão auditivo. Semelhante a cartilagem hialina é composta por fibras colágenas

tipo II, porém com abundantes fibras elásticas. Também possui pericôndrio e se multiplica principalmente por aposição (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Por sua vez a cartilagem fibrosa ou fibrocartilagem é um tecido intermediário ao conjuntivo denso. É encontrada nos discos intervertebrais, sínfise púbica e em pontos de inserção de alguns ligamentos ou tendões aos ossos. A matriz da fibrocartilagem é acidófila, por conter grande quantidade de fibras colágenas, principalmente do tipo I e na fibrocartilagem não há pericôndrio (TORTORA; DERRICKSON, 2008).

2.4.2 Diferenciação condrogênica *in vitro* das células-tronco mesenquimais da medula óssea

De uma maneira geral, as CTM apresentam capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica, miogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006; HOCH; LEACH, 2014). E essas diferenciações são controladas por vários fatores como citocinas, fatores de crescimento, moléculas da matriz extracelular e fatores de transcrição (ALMALKI; AGRAWAL, 2016).

Com relação a diferenciação condrogênica *in vitro* de CTM-MO, já existem protocolos bem definidos (SOLCHAGA et al., 2011; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011) onde as células devem ser cultivadas em um sistema de *pellet* (MACKAY et al., 1998; BOSNAKOVSKI et al., 2004; COLEMAN; CASE; GULDBERG, 2007). O meio de diferenciação básico deve possuir substâncias como ácido ascórbico, dexametasona (OKAMOTO et al., 2002; SOTTILE et al., 2002; SUVA et al., 2004; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011), albumina do soro bovino (BSA), insulina, transferrina, ácido selenoso, piruvato de sódio, prolina, L-glutanina (OKAMOTO et al., 2002; SOTTILE et al., 2002; SUVA et al., 2004) e fatores de crescimento (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011; DANISOVIC; VARGA; POLÀK, 2012). Os fatores de crescimento mais utilizados são os constituintes da superfamília de fatores de crescimentos transformadores β como TGF- β 1 (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011), TGF- β 2 e 3, além de BMP (MACKAY et al., 1998; DANISOVIC; VARGA; POLÀK, 2012).

Durante a diferenciação, que dura em torno de três semanas (BARRY et al., 2001; JACKSON et al., 2007; YOKOYAMA et al., 2008), as células mudam de uma

morfologia fibroblastoide para redondas a ovais, aumentam de volume (ALMALKI; AGRAWAL, 2016) e sintetizam matriz condrogênica que contem, dentre outros constituintes, colágenos tipo I (LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001), tipo II (LARSSON et al., 1991; SOLCHAGA et al., 2011; BARRY et al., 2001) e tipo X (LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001), proteoglicanos como agrecan (LARSSON et al., 1991; SOLCHAGA et al., 2011; BARRY et al., 2001), versican (MEHLHORN et al., 2006), decorin, biglican e fibronectina (LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001) e glicosaminoglicanos (BARRY et al., 2001). Sendo o colágeno II e o agrecan os constituintes da matriz observados em maior quantidade (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA et al., 2011).

Após a diferenciação, usam-se como marcadores a presença de matriz extracelular, especificamente colágeno II (típico da cartilagem articular) (PITTENGER et al., 1999), proteoglicanos e GAG (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011). Muitos métodos podem ser usados para a identificação desses componentes da matriz como azul de toluidina (específico para proteoglicanos), alcian blue e safranina-O (específicas para GAG) (JACKSON et al., 2007; SOLCHAGA et al., 2011; BEANE; DARLING, 2012). Os tipos de colágeno podem ser detectados ainda pela técnica de imunohistoquímica ou pela expressão gênica por PCR (reação em cadeia da polimerase) (SOLCHAGA et al., 2011).

Além do meio de indução básico utilizado para a condrogênese, outros fatores que influenciam ou potencializam a diferenciação condrogênica das CTM-MO têm sido pesquisados (DANISOVIC; VARGA; POLÁK, 2012), incluindo fatores de crescimento, fatores hormonais, transcritos gênicos, estímulo mecânico, condições de hipóxia, uso de biomateriais ou a associação desses fatores (BARRY et al., 2001; BOSNAKOVSKI et al., 2006; SHEN et al., 2009; MARKWAY et al., 2010; PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SHEN et al., 2010; DANISOVIC; VARGA; POLÁK, 2012; ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014; ZHANG; ZHANG; WANG, 2014).

Nesse contexto, o TGF- β 1, TGF- β 2 (BARRY et al., 2001) e TGF- β 3 (BARRY et al., 2001; PARK et al., 2011) potencializam a diferenciação condrogênica das CTM-MO (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010). TGF- β 1 aumenta a formação de matriz condrogênica e a expressão de colágeno II e agrecan (DANISOVIC; VARGA; POLÁK, 2012).

O TGF- β 3 também aumenta a formação de matriz condrogênica inclusive aumentando a produção de proteoglicanos (THORPE et al., 2010). Sendo que um

estudo demonstrou que o TGF- β 2 e o TGF- β 3 foram mais efetivos que o TGF- β 1 em potencializar a diferenciação condrogênica das CTM aumentando a formação de glicosaminoglicanos e de colágeno II (BARRY et al., 2001).

As BMP como BMP-2 (SEKIYA et al., 2005), BMP-4 (MILJKOVIC; COOPER; MARRA, 2008), BMP-6 (SEKIYA; COLTER; PROCKOP, 2001) e BMP-7 (SHEN et al., 2010) também são fatores importantes para a diferenciação condrogênica das CTM-MO. A BMP-2 aumenta a proliferação e a formação de matriz condrogênica (SEKIYA et al., 2005). A BMP-4 também aumenta a formação de matriz condrogênica por estimular a síntese de colágeno II e agrecan e diminui a expressão de colágeno I e X (MILJKOVIC; COOPER; MARRA, 2008). A BMP-7 potencializa a diferenciação por aumentar a expressão de colágeno II (SHEN et al., 2010).

O FGF-2 também conhecido como FGF básico (FGFb) aumenta a proliferação (SOLCHAGA et al., 2010) e a diferenciação condrogênica *in vitro* de CTM-MO (SOLCHAGA et al., 2005; SOLCHAGA et al., 2010) aumentando a formação de matriz condrogênica (SOLCHAGA et al., 2010), inclusive aumentando a produção de proteoglicanos (PARK; NA, 2008).

Estudos demonstraram ainda uma potencialização na diferenciação condrogênica das CTM-MO quando existe a combinação de fatores. Nesse contexto, a combinação de TGF- β 3 e BMP-2 (SCHMITT et al., 2003; SHEN et al., 2009) aumenta a expressão de colágeno II (SCHMITT et al., 2003); a combinação de TGF- β 3 e BMP-7 aumenta a síntese de proteoglicanos e a expressão de colágeno II e Sox9 (SHEN et al., 2010); a combinação de TGF- β 3 e BMP-6 aumenta a expressão de colágeno X (SEKIYA; COLTER; PROCKOP, 2001), e por fim, a combinação de TGF- β 1 com o IGF-1 estimula a proliferação de CTM-MO e a diferenciação condrogênica dessas células por estimular a expressão de colágeno II e Sox9 (LONGOBARDI et al., 2006).

Dentre os fatores de transcrição, o Sox9 é o principal fator que atua na diferenciação condrogênica de CTM (AUGELLO; DE BARI, 2010). Esse gene atua principalmente na fase inicial da condrogênese e controla a expressão de outros genes como agrecan e colágeno II (WANG et al., 2014). Além disso, a combinação de Sox9 com Sox5 e Sox6 estimulam a condrogênese (PARK et al., 2011) levando à produção de matriz extracelular, incluindo colágeno II e agrecan que são importantes para a formação da cartilagem (BEANE; DARLING, 2012).

Além dos Sox, outros genes também influenciam na diferenciação

condrogênica. O *zinc-finger protein 145* (ZNF145) é um fator de transcrição que tem um importante papel na diferenciação condrogênica (LIU et al., 2007), sendo que a inibição de ZNF145 diminui a diferenciação, enquanto a superexpressão desse gene aumenta a expressão de Sox9 e consequentemente a diferenciação (LIU et al., 2011).

Runt-related transcription factor 2 (Runx2), *in vitro*, atua sinergicamente com o TGF- β aumentando a expressão de interleucina 11 (IL-11), que por sua vez promove a diferenciação condrogênica (ENOMOTO et al., 2004). Enquanto o fator de transcrição osterix, em baixas expressões, é supressor da condrogênese (TOMINAGA et al., 2009),

A expressão gênica pode ser intensificada por outros fatores, como por exemplo, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) que estimula a expressão de colágeno II e Sox9, o que potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO (JAGIELSKI et al., 2014).

A superexpressão de Wnt11 estimula a expressão de colágeno II, agrecan, Sox9 (SRY-related gene 9), Runx2 e Ihh e, em sinergismo com TGF- β , promove a condrogênese (LIU et al., 2014).

Pesquisas demonstraram ainda que os condrócitos podem aumentar a diferenciação condrogênica das CTM-MO quando cultivados em sistema de co-cultura, promovendo aumento da produção de proteoglicanos e maior expressão de Sox9, agrecan e colágeno II (COOKE et al., 2011).

Outros fatores como o uso de *scaffolds* (arcabouços 3D e/ou biomateriais) também podem potencializar a diferenciação condrogênica. E isto ocorre, devido a sustentação mecânica, proteção e sustentabilidade que essas estruturas fornecem as células (NESIC et al., 2006). Por exemplo, quando CTM-MO foram cultivadas em hidrogel de fibrina associado a TGF- β 3, houve um aumento da diferenciação condrogênica dessas células (PARK et al., 2011).

A idade do doador é outro fator que pode interferir na diferenciação condrogênica das CTM-MO (BYDLOWSKI et al., 2009) visto que a diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratos e de humanos diminui em indivíduos idosos (KANAWA et al., 2013) ocorrendo uma diminuição na produção de glicosaminoglicanos e na expressão de Sox9 e colágeno II (KANAWA et al., 2013). No entanto, um estudo relatou que o potencial condrogênico de CTM-MO não é alterado em indivíduos idosos e com osteoartrite (SCHARSTUHL et al., 2007).

Finalmente, condições de hipóxia também influenciam no potencial condrogênico de CTM-MO. Um estudo realizado por Markway e colaboradores (2010) demonstrou que baixa tensão de oxigênio (2% O₂) melhorou a diferenciação condrogênica de CTM-MO de humanos por aumentar a produção de glicosaminoglicanos, proteoglicanos, colágeno II e expressão de agrecan, colágeno II e Sox9.

2.4.2.1 Efeito dos hormônios na diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea

Fatores hormonais também têm sido considerados importantes para a diferenciação condrogênica de CTM-MO (DERFOUL et al., 2006; RANDAU et al., 2013; KARL et al., 2014; ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014).

O PTH influencia a diferenciação de uma forma dose-dependente, ou seja, em concentrações baixas a moderadas (0,1 a 10 nM) aumenta a diferenciação de CTM-MO de ratos por aumentar a expressão de Sox9, colágeno II e PTH1R; no entanto, em altas concentrações (100 nM) o efeito é oposto (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014).

A dexametasona, na dose de 1 µM, potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO de bovinos por aumentar a produção de glicosaminoglicanos e a expressão de colágeno X (RANDAU et al., 2013). Em humanos, a dexametasona (100 nM) em associação com TGF-β3, potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO, pois aumenta a produção de proteoglicanos e a expressão de agrecan, colágeno II e colágeno XI (DERFOUL et al., 2006).

Em cultura de CTM-MO de humanos, a triiodotironina (T3, 1 nM) juntamente com BMP-4 estimula a hipertrofia dessas células (KARL et al., 2014). No entanto, em cultura de CTM-MO de bovinos, a T3 (100 nM) não melhora a diferenciação, pois não altera a expressão de colágeno X nem a produção de glicosaminoglicanos (RANDAU et al., 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto utilizou as bases físicas e a infra-estrutura dos seguintes laboratórios: 1) Laboratório de Cultivo de Células do Departamento de Farmácia e Nutrição do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da UFES (CCENS/UFES), 2) Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia e Nutrição do CCENS/UFES; e 3) Laboratório de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES). Para a caracterização fenotípica foi utilizado o citômetro de fluxo do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). As ratas foram provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFES. Todos os procedimentos experimentais foram executados segundo as recomendações e a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo conforme protocolo número 062/2013 (Apêndice A).

Foram utilizadas seis ratas Wistar com um mês de idade que foram eutanasiadas com sobredose de anestesia (pentobarbital sódico [30mg/kg] por via peritoneal). Imediatamente após este procedimento, seus ossos longos (fêmur e tíbia) foram colhidos assepticamente e, em seguida, submetidos à extração da medula óssea para obtenção de um *pool* de células. As CTM-MO foram cultivadas inicialmente em meio de indiferenciação DMEM, para avaliação da fenotipagem por citometria de fluxo. Posteriormente, as células foram cultivadas em meio de diferenciação condrogênico, acrescido ou não de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3), dependendo do grupo, por sete, 14 e 21 dias em um sistema de *pellets*. Foram constituídos cinco grupos experimentais de CTM-MO cultivadas em meio condrogênico: 1) CTM-MO sem T3; 2) CTM-MO com T3 (0,01 nM); 3) CTM-MO com T3 (1 nM); 4) CTM-MO com T3 (100 nM); e CTM-MO com T3 (1000 nM). Após sete, 14 e 21 dias, foram avaliados: morfologia celular e formação de matriz condrogênica pelas colorações de hematoxilina e eosina e alcian blue-PAS (ácido periódico de Schiff) e expressão de Sox9 e colágeno II por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Todos os ensaios *in vitro*, foram realizados com quatro

repetições em cada grupo e em cada período como descrito detalhadamente a seguir. A sequência dos procedimentos realizados ao longo de todo o período experimental está demonstrada resumidamente na Figura 1.

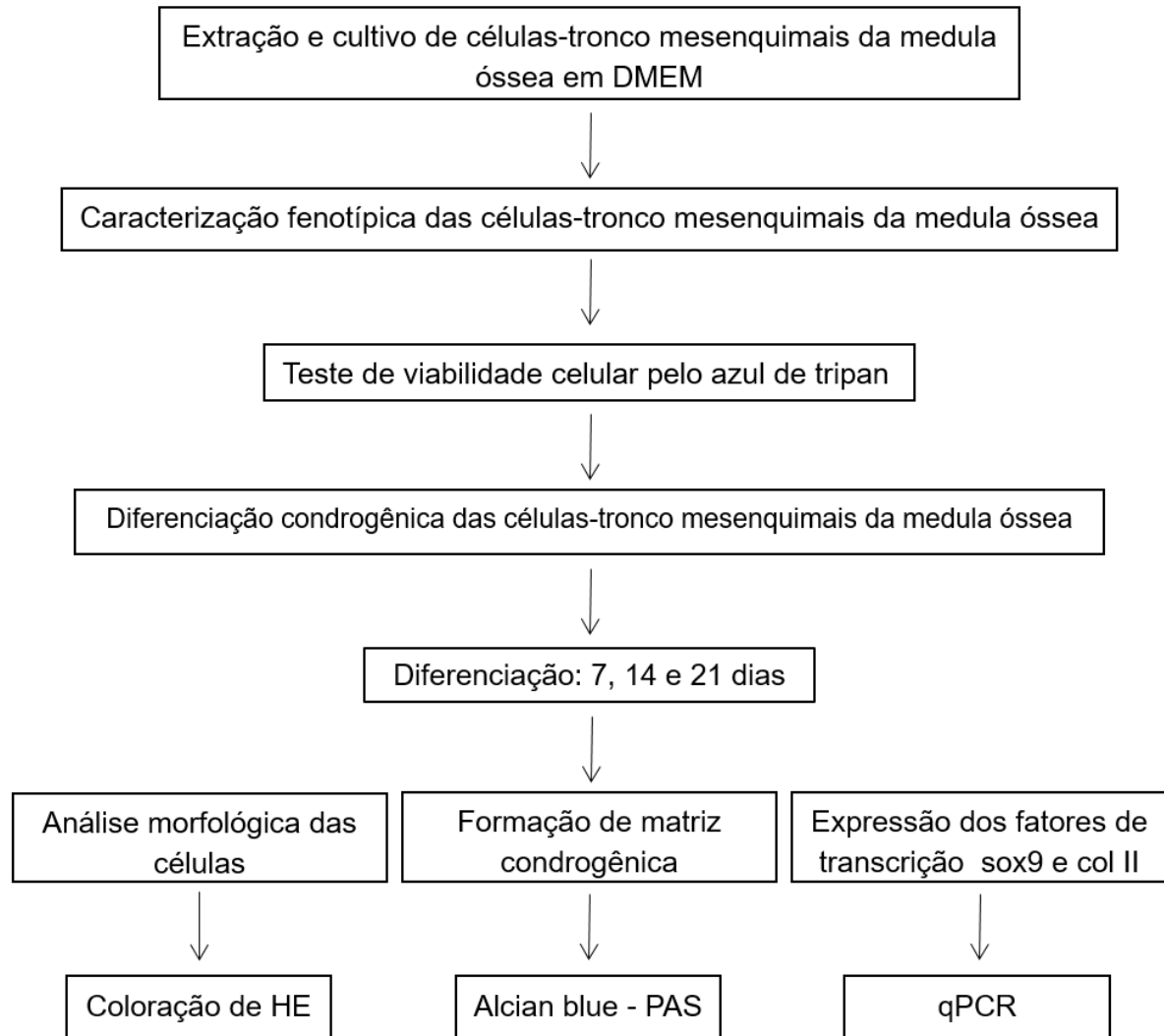


Figura 1: Fluxograma demonstrando os procedimentos realizados ao longo de todo o período experimental. *HE: hematoxilina e eosina; PAS: ácido periódico de Schiff; qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real.

3.1 Extração e cultivo de células-tronco mesenquimais em DMEM

A extração das CTM-MO foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (OCARINO et al., 2008; BOELONI et al., 2009; BOELONI et al., 2013ab). Em um ambiente cirúrgico realizou-se a remoção dos pelos e a antissepsia na pele da região dos membros posteriores. Em seguida, os fêmures e tíbias (direitos e

esquerdos) das ratas jovens (um mês de idade) saudáveis foram dissecados de tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica, para obtenção da medula óssea da diáfise. Os ossos foram colocados em meio DMEM (Invitrogen, CA, USA). No fluxo laminar, a medula óssea foi lavada com DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L). Após centrifugação por 10 minutos a 1400g, as células foram cultivadas por aproximadamente 30 dias em garrafas T75 contendo DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Brasil) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de microrganismos.

3.2 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais da medula óssea

Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, foi realizada a caracterização fenotípica das CTM-MO por citometria de fluxo conforme protocolo já estabelecido (BOELONI et al., 2013ab). As células inicialmente foram tripsinizadas utilizando-se tripsina (0,05% Trypsin-EDTA 1X; Gibco, USA), contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços (fundo redondo) com concentração de 1×10^6 células/poço, sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação. Posteriormente, foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante (DMEM) e adição de 2µL do anticorpo primário e 20µL de tampão de fosfato-salino (PBS) 0,15M/poço. A placa foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e a placa foi novamente agitada em vórtex. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante e de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço, agitação em vórtex e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Adicionou-se o anticorpo secundário (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Oregon, USA) com diluição de 1:200. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, adicionaram-se

150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de PBS 0,15M e 100µL de formaldeído a 4%. A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*) empregando o software *Cell Quest*, com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (*Forward scatter*) e SSC (*Side scatter*) em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica que detecta luz de comprimento de onda de 530nm, que corresponde a fluorescência verde, para análises pelo programa WinMDI por gráficos de *dot plot* e histogramas. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-CD54 (clone 1A29 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD90 (clone Ox-7 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.3 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripan

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTM-MO foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripan. Inicialmente, as CTM-MO foram cultivadas em garrafas T75 com DMEM e no momento do teste foram lavadas com PBS (0,15M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1400rpm por 10 minutos, ressuspensas em meio e coradas pelo azul de Tripan. As células inviáveis (em azul) e viáveis (transparentes) foram quantificadas em câmara de Neubauer. Sendo preconizado que as células viáveis ficassem o mais próximo possível de 100% de viabilidade.

3.4 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea

A diferenciação condrogênica das CTM-MO foi feita por sete, 14 e 21 dias e realizado conforme protocolos previamente definidos (SOLCHAGA, PENICK, WELTER, 2011; BEANE; DARLING, 2012). Após o cultivo em DMEM e obtenção de confluência de 80 a 90% das CTM, o meio foi substituído por meio condrogênico (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit; Gibco, USA) e as células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, sendo a troca de meio realizada sistematicamente uma vez por semana. Assim, as CTM das ratas foram cultivadas em sistema de *pellets* em uma quantidade previamente padronizada (5×10^5 células), em quatro repetições, em tubos de 15 mL durante sete, 14 e 21 dias com um volume de 500 µL por tubo. Após esses períodos foram avaliados: a expressão de Sox9 e colágeno II por qPCR e, a análise histomorfométrica das células (formação de matriz condrogênica). As doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3; Sigma-Aldrich) foram estabelecidas conforme estudos realizados por Boeloni e colaboradores (2009; 2013ab), sendo a dose de 0,01 nM semelhante à dose fisiológica.

3.5 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica

Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), as células cultivadas em tubos de 15 mL e em sistema de *pellets*, foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas em formaldeído 10% tamponado por uma hora, processadas pelo método rotineiro de inclusão em parafina conforme protocolo já estabelecido (SOLCHAGA et al., 2011). O processamento consistiu na seguinte sequência: 1) álcool 70% (30 minutos); 2) álcool 80% (30 minutos); 3) álcool 90% (30 minutos); 4) álcool absoluto I (30 minutos); 5) álcool absoluto II (30 minutos); 6) álcool absoluto III (30 minutos); 7) xilol I (20 minutos); 8) xilol II (20 minutos); 9) xilol III (20 minutos); 10) parafina I (20 minutos); 11) parafina II (20 minutos) e; 12) parafina III (20 minutos).

Após o processamento, as amostras foram cortadas em micrótomo em 4 µm e submetidas as colorações de hematoxilina-eosina (HE) e AB-PAS (alcian blue-ácido

periódico de Schiff) para a análise da morfologia e da formação de matriz condrogênica (especificamente glicosaminoglicanos – GAG). As técnicas das colorações estão descritas a seguir. Como controle positivo das colorações especiais foi utilizado tecido cartilaginoso presente na orelha.

A) Hematoxilina e eosina: 1) desidratação; 2) água corrente (passagem); 3) água destilada (passagem); 4) hematoxilina de Harris - 5 min; 5) álcool de passagem; 6) eosina - 1min; 7) desidratação e montagem.

B) Alcian blue-PAS: 1) desidratação; 2) alcian blue - 30min; 3) ácido periódico 0,5% - 15min; 4) água corrente -10 min - água destilada (passagem); 5) reativo de Schiff -15 min; 6) sem lavar passar metabissulfito de sódio 1% - 5 min; 7) água corrente - 10 min - água destilada (passagem); 8) desidratação e montagem.

A análise morfológica das lâminas foi feita por dois observadores e os escores das amostras foram determinados por análise semiquantitativa, considerando-se a distribuição e intensidade da marcação para AB e para PAS. Para a formação de matriz condrogênica (AB+ e PAS+), as comparações entre os grupos seguiu os seguintes parâmetros: distribuição [ausente=0, focal=1, multifocal=2, difusa=3] e intensidade [ausente=0, discreta=1, moderada=2, acentuada=3]. Os parâmetros foram multiplicados e o escore resultante foi utilizado.

3.6 Expressão dos fatores de transcrição Sox9 e colágeno II por qPCR

A qPCR foi utilizada nas culturas de CTM-MO de todos os grupos experimentais para a avaliação quantitativa da expressão de Sox9 e colágeno II (Col II). A extração do RNA total das células cultivadas foi feita pelo uso do Trizol (Trizol® Reagent, Invitrogen, CA, USA). Inicialmente foi realizada a lise e homogeneizado da monocamada de células por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL, acrescido de 0,2mL de clorofórmio, sendo homogeneizado por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4°C, objetivando separar em três fases, sendo a fase incolor e superficial, a que conterá o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5mL de álcool isopropílico e incubação por 10

minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi lavado com 1mL de etanol a 75%, homogenizado e centrifugado a 7.500g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água livre de RNase e imediatamente estocado a -80°C. A qualidade das amostras de RNA de cada cultura foi analisada por espectrofotometria. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se Kit comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, CA, USA). Foram realizadas as reações de no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems Inc., CA, USA). A expressão relativa de cada gene foi normalizada com o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) usando o método 2- $\Delta\Delta C_t$ (SCHEFE et al., 2006). Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* e estão descritos na tabela 1.

TABELA 1. Genes e sequências de nucleotídeos dos iniciadores para qPCR para *Rattus norvegicus*.

Genes	Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')
GAPDH	<i>Forward primer</i> CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA
	<i>Reverse primer</i> GGCATGGACTGTGGTCATGA
Sox9	<i>Forward primer</i> CTGAAGGGCTACGACTGGAC
	<i>Reverse primer</i> TACTGGTCTGCCAGCTTCCT
Colágeno II	<i>Forward primer</i> AGGGGTACCAGGTTCTCCATC
	<i>Reverse primer</i> CTGCTCATCGCCGCGGTCCGA

3.7 Análise estatística

O delineamento foi multifatorial (5 grupos x 3 períodos). Para as análises da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste post hoc de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$. Para as análises dos resultados do qPCR, realizou-se análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls* (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais da medula óssea

As características fenotípicas das células extraídas da medula óssea de ratas jovens saudáveis foram compatíveis com a de células-tronco. Houve expressão de CD45 em 3,06%, CD54 em 95,10%, CD73 em 93,99% e CD90 em 86,77% das células.

4.2 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação condrogênico, as CTM-MO apresentavam no mínimo 90% de viabilidade. Assim, garantiu-se que as células utilizadas para a diferenciação condrogênica estavam viáveis e que isso não seria um fator limitante para a próxima etapa do cultivo.

4.3 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica

4.3.1 Morfologia das células-tronco mesenquimais da medula óssea

Aos sete dias, o grupo controle apresentava células pequenas redondas a ovais com núcleos picnóticos. Os demais grupos tratados com T3 (0,01; 1 e 100 nM) apresentaram a mesma morfologia descrita no grupo controle, com exceção do grupo tratado com 1000 nM T3, que apresentou morfologia celular variando de células pequenas redondas com núcleos picnóticos a células volumosas com núcleos volumosos (Figura 2A, B, C, D, E).

Aos 14 dias, todos os grupos tratados com T3 apresentavam células volumosas, núcleos ora picnóticos ora volumosos e discreta quantidade de células binucleadas, semelhante ao grupo controle (Figura 2F, G, H, I, J).

Aos 21 dias de diferenciação, o grupo controle apresentou células volumosas com núcleo ora picnótico ora grande predominantemente deslocado para a periferia e discreta quantidade de células binucleadas e cromatina ora frouxa ora condensada. Os grupos tratados com 0,01; 1 e 100 nM T3 apresentavam células com morfologia semelhante ao grupo controle (Figura 2K, L, M, N). No entanto, o grupo tratado com 1000 nM T3 apresentou células maiores em comparação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com T3, sendo as células predominantemente volumosas e com núcleo deslocado para a periferia, cromatina ora frouxa ora condensada e discreta quantidade de células binucleadas (Figura 2O).

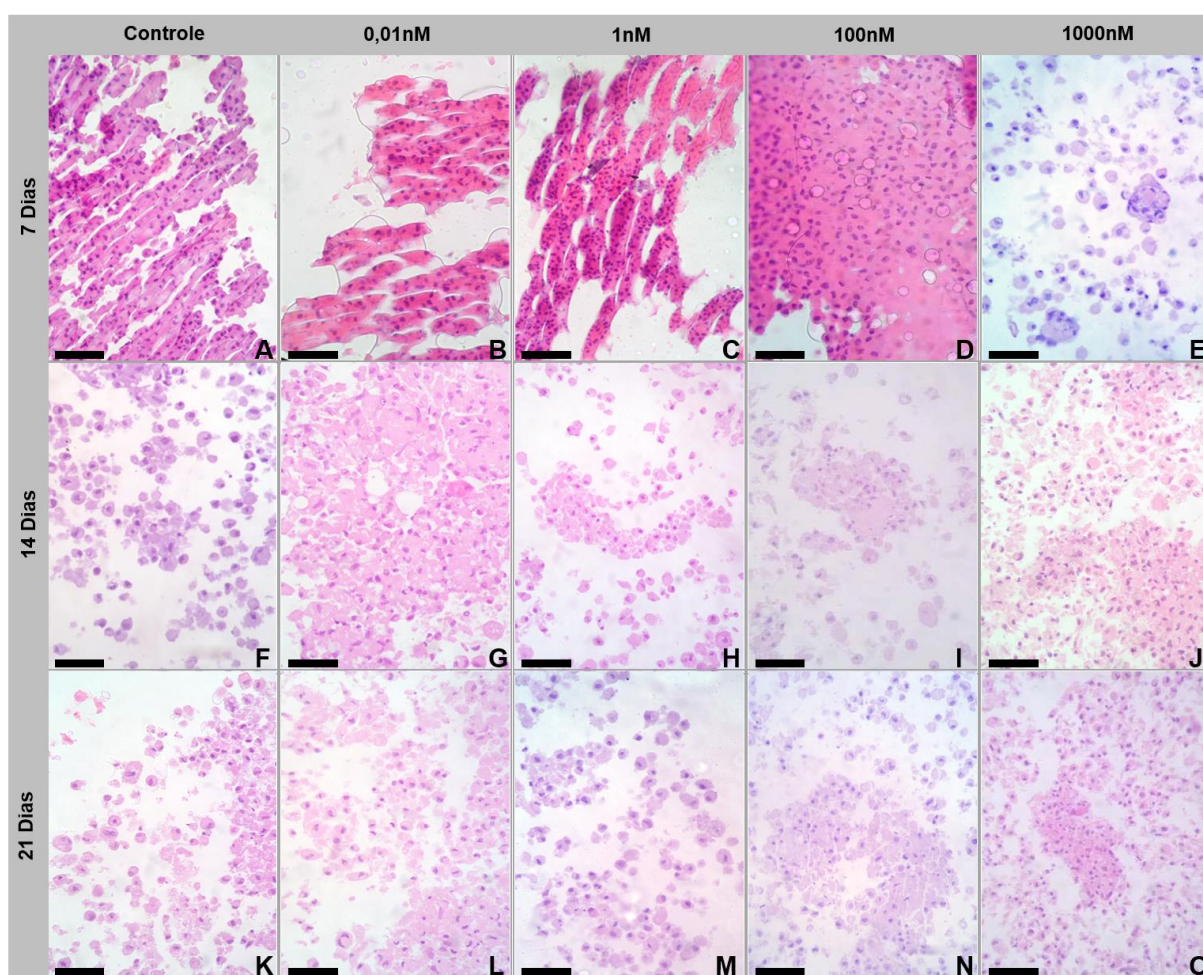


Figura 2. Morfologia das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. HE, Barra = 52,55μm.

4.3.2 Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+

Aos sete dias, o grupo controle e os grupos tratados com 0,01; 1 e 100 nM T3 não apresentaram formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+, enquanto o grupo tratado com 1000 nM T3 apresentou formação de matriz AB+ e PAS+ superiores ao grupo controle e aos demais grupos tratados com T3 ($p < 0,05$) (Figuras 3A-E, 4A e 5A).

Aos 14 dias, todos os grupos tratados com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM T3) apresentavam matriz condrogênica AB+ semelhante ao grupo controle ($P > 0,05$). No entanto, os grupos tratados com 0,01 e 1000 nM T3 demonstraram matriz PAS+ superior em relação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com T3 ($p < 0,05$) (Figuras 3F-J, 4B e 5B).

Aos 21 dias, todos os grupos tratados com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM T3) apresentavam matriz condrogênica AB+ semelhante ao grupo controle ($P > 0,05$). No entanto, os grupos tratados com 0,01 e 1 nM T3 demonstraram matriz PAS+ superior em relação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com T3 ($p < 0,05$) (Figuras 3K-O, 4C e 5C).

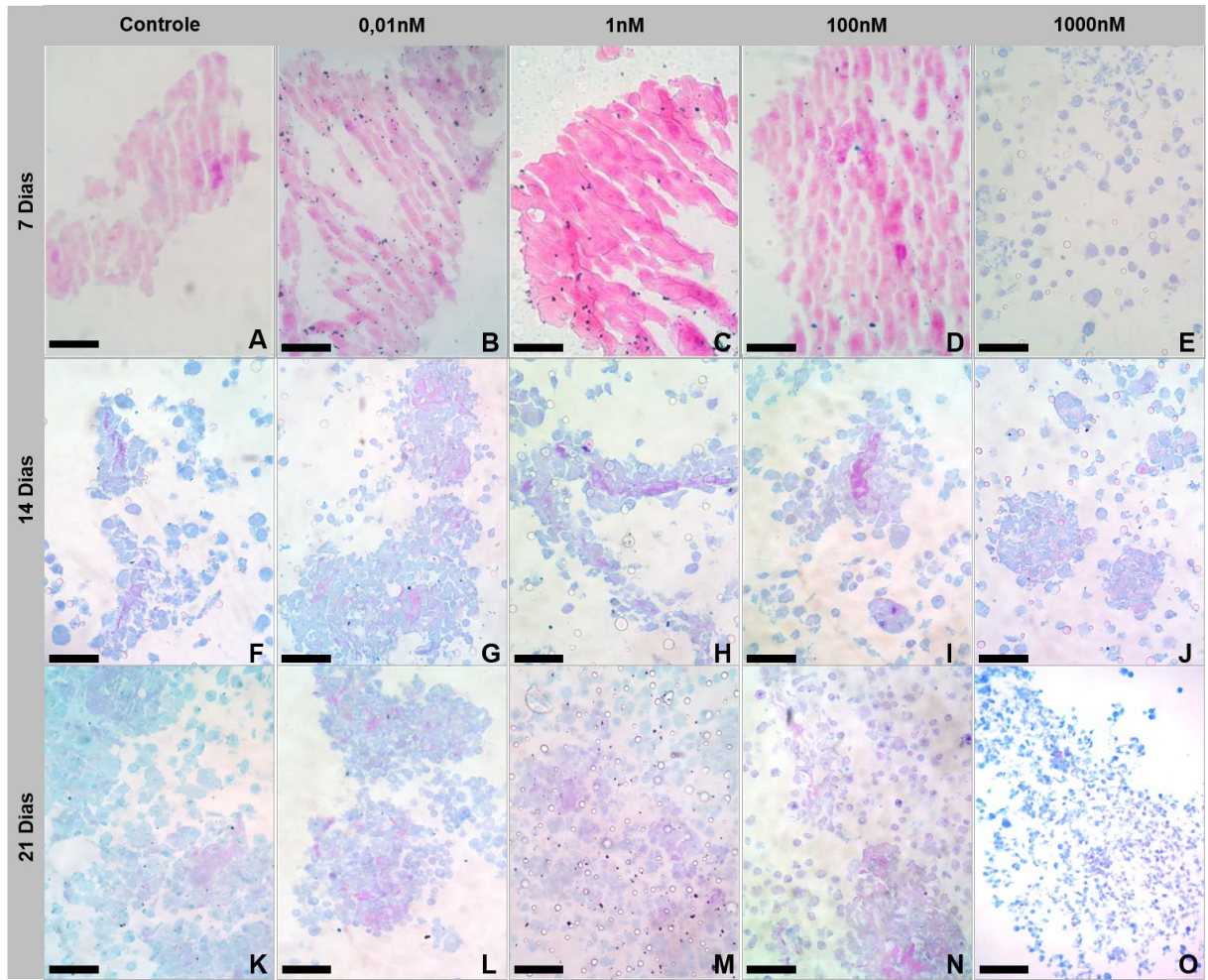


Figura 3. Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. HE, Barra = 52,55µm.

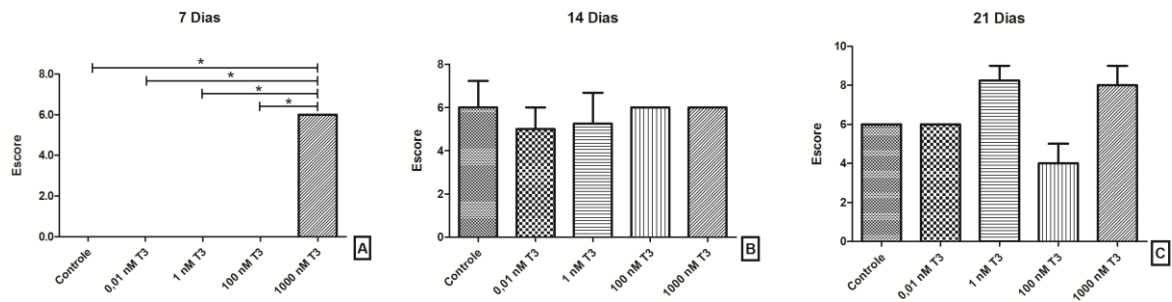


Figura 4. Produção de matriz condrogênica AB+ em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05.

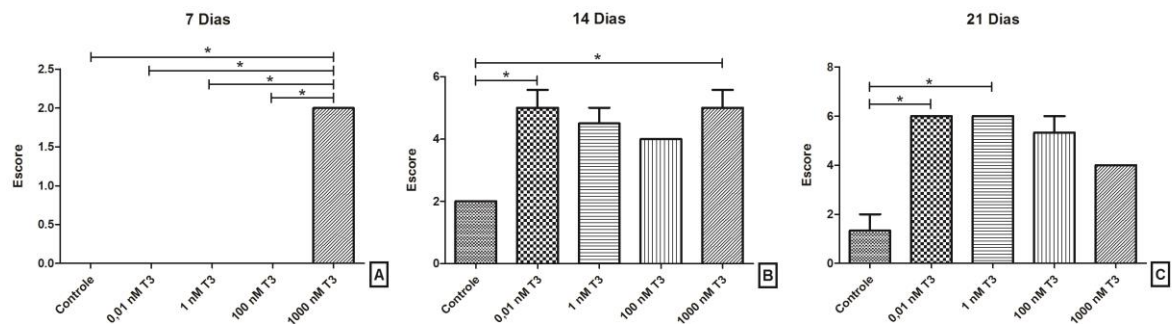


Figura 5. Produção de matriz condrogênica PAS+ em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05.

4.4 Expressão dos fatores de transcrição Sox9 e Col II

A expressão dos genes Sox9 e Col II foi mensurada utilizando-se a técnica de q-PCR, aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. Com relação a expressão de Sox9, tanto aos sete quanto aos 14 dias, todos os grupos tratados com T3 apresentaram expressão semelhante ao grupo controle (p>0,05). Porém, aos 21 dias, o grupo tratado com 1000 nM de T3 apresentou expressão significativamente (p<0,05)

superior ao controle e aos demais grupos tratados com T3 (0,01; 1 e 100 nM) (Figura 6A, B, C).

Em relação a expressão de Col II, aos 7 dias, os grupos tratados 1, 100 e 1000 nM T3 apresentaram expressão estatisticamente semelhante ao grupo controle. No entanto, o grupo tratado com 0,01 nM foi superior ao controle e aos demais grupos tratados com T3 (Figura 6D).

Aos 14 dias, os grupos tratados 0,01; 100 e 1000 nM T3 apresentaram expressão estatisticamente semelhante ao grupo controle. No entanto, o grupo tratado com 1 nM foi superior ao controle e aos demais grupos tratados com T3 (Figura 6E).

Aos 21 dias, todos os grupos tratados com T3 apresentaram expressão de Col II semelhante ao grupo controle (Figura 6F).

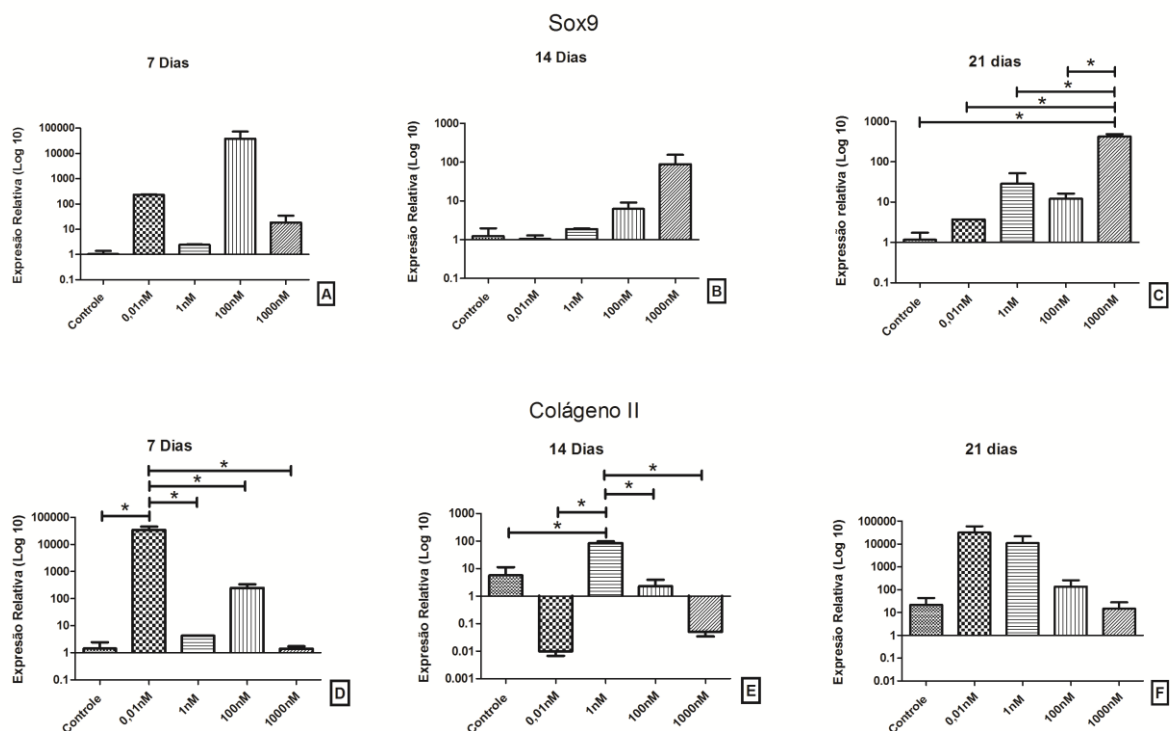


Figura 6. Expressão relativa de Sox9 e colágeno II (Col II) (média \pm desvio padrão em quadruplicata/grupo) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, D), 14 (B, E) e 21 dias (C, F) de diferenciação condrogênica. * $p < 0,05$.

Quando avaliamos a expressão de Sox9 em cada grupo ao longo dos períodos de diferenciação verificamos que: nos grupos controle e tratados com 1 e 100 nM T3 não houve diferença na expressão ao longo do tempo (Figura 7A, C, D). Entretanto, no grupo tratado com 0,01 nM T3 a expressão foi maior aos 7 dias e manteve-se semelhante aos 14 e 21 dias, enquanto no grupo 1000 nM T3 a expressão foi maior aos 21 dias (Figura 7B e E).

Quando avaliamos a expressão de Col II em cada grupo ao longo dos períodos de diferenciação verificamos que: todos os grupos não apresentaram variação nessa expressão ao longo do tempo (Figura 8).

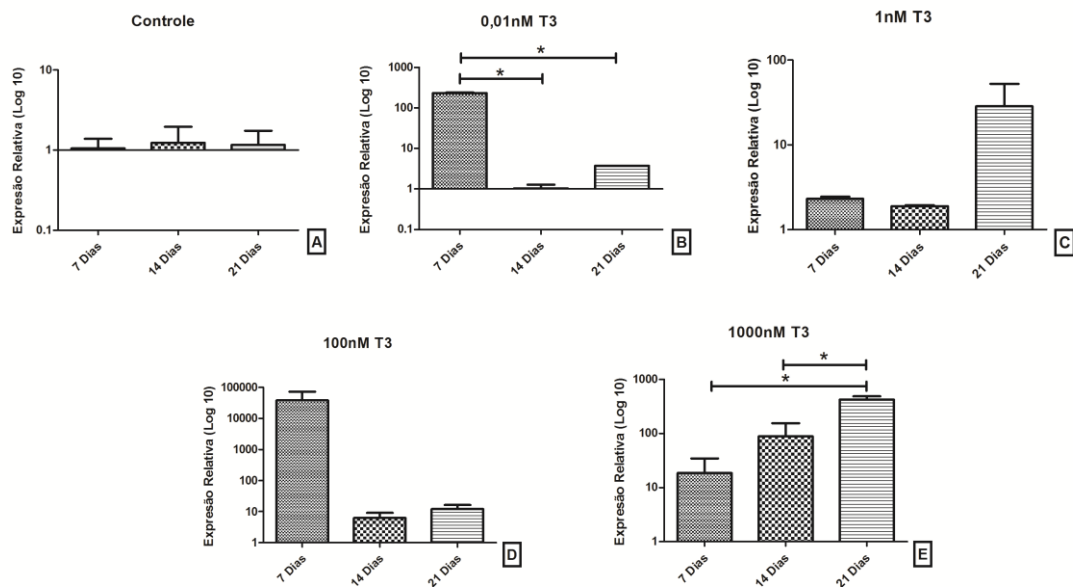


Figura 7. Expressão relativa de Sox9 (média \pm desvio padrão em quadruplicata/grupo) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. * $p < 0,05$.

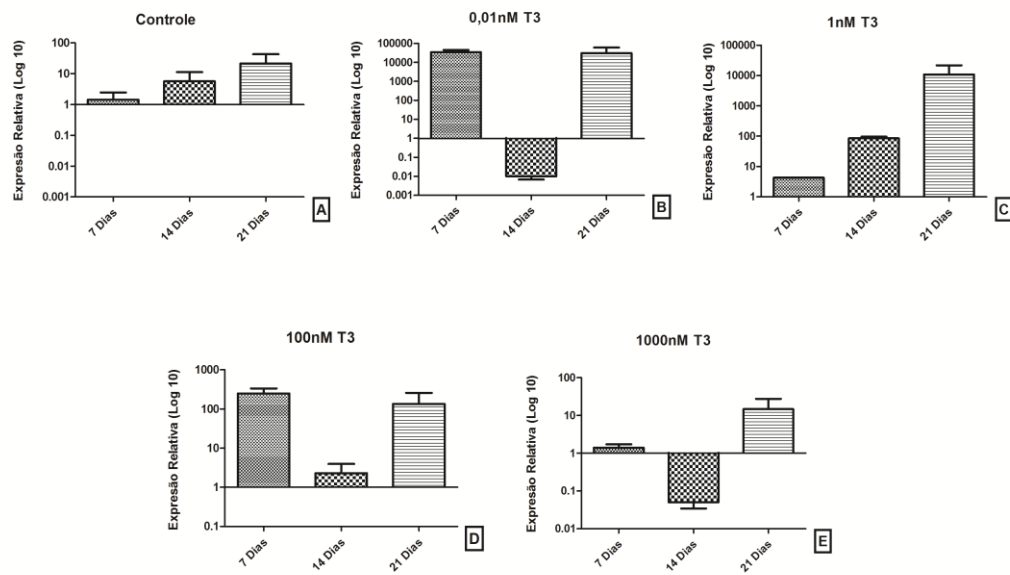


Figura 8. Expressão relativa de colágeno II (Col II) (média \pm desvio padrão em quadruplicata/grupo) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A T3 influenciou de forma dose dependente a diferenciação condrogênica das CTM-MO de ratas, visto que o tratamento hormonal aumentou não só aumentou a expressão de genes importantes para diferenciação condrogênica, mas também, influenciou na morfologia e produção de matriz condrogênica, uma vez que a dose de 0,01 nM T3 aumentou a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 e colágeno II em pelo menos um dos períodos avaliados, a dose de 1 nM T3 aumentou a formação de matriz condrogênica e a expressão de colágeno II em pelo menos um dos períodos avaliados; e a dose de 1000 nM T3 estimulou precocemente a hipertrofia celular, aumentou a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 em pelo menos um dos períodos avaliados.

As características fenotípicas das células extraídas da medula óssea de ratas foram compatíveis com a de células-tronco mesenquimais, pois as células expressaram CD54, CD73 e CD90 e expressaram baixa quantidade de CD45. Corroborando como o preconizado pela International Society for Cellular Therapy (DOMINICI et al., 2006; SCHÄFFLER, BÜCHLER, 2007). O CD54 não é uma molécula exclusiva de CTM e pode ser expressa em pequenas concentrações em células endoteliais e leucócitos (ROEBUCK, FINNEGAN, 1999). O CD90 e o CD73 também não são exclusivos de CTM e podem ser expressos em fibroblastos (PILLING et al., 2009; ALT et al., 2011). O CD45 é um marcador de células hematopoiéticas e macrófagos (CRAIG et al., 1994; MCINTOSH et al., 2006; PILLING et al., 2009) que também pode ser expresso em fibroblastos (ISHII et al., 2005b). Assim, a baixa expressão desse marcador observada nas CTM-MO estudadas, pode ter ocorrido pois a medula óssea possui, além de CTM, fibroblastos (ISHII et al., 2005a) e células hematopoiéticas (BOBIS, JAROCHA, MAJKA, 2006; BARA et al., 2014). Apesar dessas informações, células hematopoiéticas não aderem a superfícies plásticas (PAYUSHINA, DOMARATSKAYA, STAROSTIN, 2006) e, dentre as células presentes na medula óssea, somente as CTM apresentam capacidade de diferenciação condrogênica.

Com o intuito de caracterizar a diferenciação condrogênica das CTM-MO, alguns parâmetros foram utilizados, tais como: síntese de matriz condrogênica e

expressão de Sox9 e Col II. Esses parâmetros têm sido amplamente utilizados por outros pesquisadores para confirmar a diferenciação condrogênica (LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001; MEHLHORN et al., 2006; AUGELLO; DE BARI, 2010; PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA et al., 2011; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011).

Durante a análise de formação de matriz condrogênica, a dose de 100 nM de T3 não alterou a formação de GAG sobre as CTM-MO. No entanto, o tratamento hormonal com T3 potencializou a formação de matriz extracelular (especificamente GAG) de forma dose dependente, pois a dose de 0,01 nM foi superior aos 14 e 21 dias, a dose de 1 nM foi superior aos 21 dias e a dose de 1000 nM apresentou melhores resultados aos sete e 14 dias de diferenciação. Em cultura de CTM-MO de bovinos com alginato, T3 na dose de 100 nM também não alterou a produção de GAG aos 21 dias de diferenciação (RANDAU et al., 2013). No entanto, em cultura de CTM do cordão umbilical humano a T3 (100 ng/mL) promoveu aumento de proteoglicanos aos 14 dias de diferenciação condrogênica. Outros resultados indicam que *GAG-mimetic peptide nanofibers* foi capaz de induzir diferenciação condrogênica das CTM-MO de ratos (YAYLACI et al., 2016). Esses resultados demonstram que o efeito do hormônio tireoidiano sobre a síntese de matriz extracelular pode ser influenciado pela dose hormonal, pela espécie do doador das CTM e pelo tempo de diferenciação. Pode-se sugerir ainda que o aumento de GAG observado após o tratamento com as doses de 0,01, 1 e 1000 nM T3 pode explicar o melhor potencial condrogênico das CTM-MO.

O tratamento hormonal, além de aumentar a formação de GAG aos 14 e 21 dias (0,01 nM T3) e aos 21 dias (1nM T3), também influenciou na expressão de colágeno II, pois as doses de 0,01 e 1 nM T3 aumentaram a expressão desse gene aos sete e 14 dias de diferenciação respectivamente. No entanto, a expressão de colágeno II não alterou ao longo do tempo em todos grupos testados, demonstrando que o efeito de T3 sobre essa expressão foi somente dose-dependente. Outro estudo também demonstrou o efeito benéfico de T3 sobre a diferenciação condrogênica de células-tronco do cordão umbilical humano onde foi verificado que a T3 na dose de 100ng/ml aumentou a expressão de colágeno II aos 14 dias de diferenciação (FERNÁNDEZ-PERNAS et al., 2016). Existem algumas diferenças do estudo de FERNÁNDEZ-PERNAS et al. (2016) em relação a presente pesquisa, pois o efeito de T3 sobre a diferenciação condrogênica foi testado em células-tronco do

cordão umbilical humano e em uma dose muito superior a testada no presente estudo. Dessa forma, podemos sugerir que o sítio de doação, bem como a espécie do doador e a dose de T3 podem influenciar no efeito dos hormônios tireoidianos sobre a diferenciação condrogênica de CTM.

O colágeno II é um dos principais constituintes da matriz cartilaginosa e por isso a expressão desse gene é amplamente utilizada para verificar a diferenciação condrogênica de CTM (PITTENGER et al., 1999; PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA et al., 2011). O que se tem conhecimento é que durante a diferenciação condrogênica *in vivo*, o colágeno II é expresso em todas as células condroprogenitoras e em altos níveis em condrócitos (CHEAH et al., 1991) e gradativamente essa expressão vai sendo substituída pela expressão de colágeno X (LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001). Outros resultados indicam que o colágeno II sozinho tem potencial para induzir e manter a diferenciação condrogênica de CTM-MO de bovinos (BOSNAKOVSKI et al., 2006). Assim, pode-se sugerir que o aumento da expressão de colágeno II observado após o tratamento com as doses de 0,01 e 1 nM T3 pode melhorar o potencial condrogênico das CTM-MO.

Dentre as doses de T3 estudadas, a dose de 1000 nM foi a única que influenciou a expressão de Sox9 e isto ocorreu somente aos 21 dias de diferenciação. A T3 (100 ng/mL) em cultura de CTM do cordão umbilical humano aumentou a expressão de Sox9 aos 14 dias de diferenciação condrogênica (FERNÁNDEZ-PERNAS et al., 2016). Mas, quando se estudou o efeito das doses de T3 sobre a expressão de Sox9 ao longo do tempo de diferenciação, verificou-se que a dose de 0,01 nM T3 promoveu um pico de expressão aos sete dias e a dose de 1000 nM T3 aumentou gradativamente a expressão desse gene durante o período de diferenciação, tendo seu pico de expressão aos 21 dias. Dentre a ampla literatura consultada nenhum trabalho verificou como a expressão de Sox9 se comportou ao longo do período de diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas. O Sox9 é o principal fator que atua na diferenciação condrogênica de CTM (AUGELLO; DE BARI, 2010) e é expresso durante todo o período de diferenciação (NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997; KOCH et al., 2000). Esse gene atua principalmente na fase inicial da diferenciação e também controla a expressão de outros genes como agrecan e colágeno II (WANG et al., 2014) e não é expresso em condrócitos hipertróficos (WRIGHT et al., 1995; NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997; LEFEBVRE; DE

CROMBRUGGHE, 1998). Assim, a maior expressão de Sox9 em CTM-MO tratadas com 1000 nM T3 aos 21 dias associado demonstra o efeito benéfico do tratamento hormonal sobre a diferenciação condrogênica de CTM-MO.

De forma interessante, o tratamento hormonal com a dose de 1000 nM T3 estimulou uma hipertrofia celular precoce em CTM-MO e manteve essa característica até o final da diferenciação condrogênica. É sabido que as células não sofrem hipertrofia no período inicial da diferenciação como observado neste estudo. O que se tem conhecimento é que as células apresentavam uma morfologia fibroblastoide na fase inicial e somente nas fases posteriores sofrem hipertrofia (STUDER et al., 2012; ALMALKI; AGRAWAL, 2016). T3 (1 nM) com redução de dexametasona e sem associação com TGF beta, estimula hipertrofia e apoptose de CTM-MO de humanos aos 14 dias de diferenciação condrogênica (MUELLER; TUAN, 2008). Em cultura de CTM-MO de humanos, a T3 (1 nM) também estimula a hipertrofia dessas células mediado pela BMP-4 (KARL et al., 2014). Entretanto, a T3 (100 ng/mL) em cultura de CTM do cordão umbilical humano promoveu a condrogênese, não estimulou hipertrofia, aumentou a expressão de Sox9 e diminuiu a marcação de MMP13, colágeno X e fosfatase alcalina aos 14 dias de diferenciação (FERNÁNDEZ-PERNAS et al., 2016). Provavelmente nossos resultados diferem dos observados por esses autores pois a espécie doadora, o tipo celular e a dose hormonal são diferentes.

Pesquisas demonstram ainda o efeito de T3 sobre a hipertrofia de condrócitos. T3 (100 nM) na ausência de dexametasona demonstrou uma tendência a induzir hipertrofia em condrócitos de bovinos, mas não ocorreu uma diminuição no conteúdo de DNA, assim, provavelmente não ocorreu indução de apoptose nessas células (RANDAU et al., 2013). T4 (30ng/mL) atuam *in vitro* sobre condrócitos em fase terminal de diferenciação diminuindo a expressão de Sox9 e consequentemente estimulando a hipertrofia celular, além de aumentar a expressão de colágeno X, atividade da fosfatase alcalina e formação de proteoglicanos (OKUBO; REDDI, 2003). T3 (100 nM) estimula a hipertrofia de ATDC cells (*clonal mouse embryonal carcinoma cells*) aos 21 dias de condrogênese *in vitro* (SIEBLER et al., 2002). A T3 (100 ng/mL) também estimula a hipertrofia de condrócitos aos 7 e 21 dias de condrogênese *in vitro* (ROBSON et al., 2000). A hipertrofia de condrócitos *in vivo* envolve alterações na osmolaridade intra e extracelulares, degradação da matriz ao redor dos condrócitos e uma aumento na quantidade de organelas o que altera a

função celular (MACKIE et al., 2011). Além disso, os condrócitos hipertróficos expressam colágeno X e MMP13 e sofrem apoptose (JOHANSSON et al., 1997; DE CROMBRUGGHE et al., 2000; DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001; CHEUNG et al., 2003). Uma das hipóteses para tentar explicar a diferença dos resultados observados em condrócitos em comparação aos resultados observados em CTM é que o grau de maturidade celular também pode influenciar no efeito dos hormônios tireoidianos sobre a hipertrofia celular.

No entanto, apesar da característica de hipertrofia ter sido observada nas células tratadas com 1000 nM T3 de forma precoce, essa característica não influenciou na formação de matriz condrogênica, uma vez que este grupo apresentou maior formação de GAG e não houve diminuição na expressão de colágeno II em relação aos demais grupos estudados aos sete e 14 dias de diferenciação. Além disso, provavelmente o tempo de cultivo utilizado em nosso experimento não foi suficiente para induzir apoptose das CTM-MO. No entanto, estudos verificando o efeito da triiodotironina sobre a proliferação e apoptose de CTM-MO são necessários.

É importante ressaltar ainda que, os resultados do presente trabalho poderiam contribuir de forma significativa para o tratamento de doenças ou defeitos no tecido cartilaginoso, pois o tratamento com T3 poderia potencializar a diferenciação condrogênica *in vitro* das CTM-MO antes da utilização dessas células para a terapia celular. Visto que o tecido articular é um tecido com limitado poder de regeneração após sofrer qualquer tipo de injúria (TANG; WANG, 2015) decorrente de propriedades intrínsecas como baixa vascularização e inervação (DANISOVIC; VARGA; POLÁKI, 2012). No entanto, pesquisas futuras utilizando CTM-MO tratadas *in vitro* com T3 e depois implantadas *in vivo* em pacientes com doenças ou defeitos cartilagosos podem ser melhor investigados.

6. CONCLUSÕES

A triiodotironina tem efeito dose-dependente sobre a diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas, onde 0,01 nM T3 é a dose que apresenta o melhor efeito por aumentar a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 e colágeno II em pelo menos um dos períodos avaliados.

7. REFERÊNCIAS

ALMALKI, S.G.; AGRAWAL, D.K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. **Differentiation**, v.92, n.1-2, p.41-51, 2016.

ALT, E.; YAN, Y.; GEHMERT, S.; SONG, Y.H.; ALTMAN, A.; GEHMERT, S.; VYKOUKAL, D.; BAI, X. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. **Biology of the Cell**, v.103, n.4, p.197-208, 2011.

AUGELLO, A.; DE BARI, C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. **Human Gene Therapy**, v.21, n.10, p.1226-1238, 2010.

BANFI, A.; MURAGLIA, A.; DOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v.28, n.6, p.707-715, 2000.

BARA, J.J.; RICHARDS, R.G.; ALINI, M.; STODDART, M.J. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. **Stem Cells**, v.32, n.7, p.1713-1723, 2014.

BARLOW, S.; BROOKE, G.; CHATTERJEE, K.; ROSSETTI, T.; DOODY, M.; VENTER, D.; PAIN, S.; GILSHENAN, K.; ATKINSON, K. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v.17, n.6, p.1095-1108, 2008.

BARRY, F.; BOYNTON, R.E.; LIU, B.; MURPHY, M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Experimental Cell Research**, v.268, n.2, p.189-200, 2001.

BEANE, O.S.; DARLING, E.M. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. **Annals of Biomedical Engineering**, v.40, n.10, p.2079-2097, 2012.

BIANCO, A. C.; KIM, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*, v. 116, n. 10, p. 2571-2579, 2006.

BJERKNES, M.; CHENG, H. Intestinal Epithelial Stem Cells and Progenitors. **Methods in Enzymology**, v.419, p.337-383, 2006.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.44, n.4, p.215-30, 2006.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; BOZZI, A.; SILVA, J.F.; CASTANHEIRA, P.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Dose-dependent effects of triiodothyronine on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Hormone Research**, v.72, n.2, p.88-97, 2009.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; SILVA, J.F.; CORRÊA, C.R.; BERTOLLO, C.M.; HELL, R.C.; PEREIRA, M.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and non-ovariectomized female rats with thyroid dysfunction. **Pathology Research and Practice**, v.209, n.1, p.44-51, 2013a.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.57, n.1, p.62-70, 2013b.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Comparative study of osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue of osteoporotic female rats. **Connective Tissue Research**, v.55, n.2, p.103-114, 2014.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. In vitro effects of triiodothyronine on the reduced osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells of rats with osteoporosis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.8, n.3, p.76-87, 2015.

BONAB, M.M.; ALIMOGHADDAM, K.; TALEBIAN, F.; GHAFFARI, S.H.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biology**, v.7, n.14, p.1-7, 2006.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; ISHIGURO, T.; OKUMURA, M.; IWANAGA, T.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. **Experimental Hematology**, v.32, n.5, p.502-509, 2004.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMUR, M.; FUJINAG, T. Gene expression profile of bovine bone marrow mesenchymal stem cell during spontaneous chondrogenic differentiation in pellet culture system. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, v.53, n.3-4, p.127-139, 2006.

BREINAN, H.A.; MINAS, T.; HSU, H.P.; NEHRER, S.; SLEDGE, C.B.; SPECTOR, M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.79, n.10, p.1439-1451, 1997.

BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.64, n.2, p.278-294, 1997.

BURCH, W.M.; LEOVITZ, H.E. Triiodothyronine stimulation of in vitro growth and maturation of embryonic chick cartilage. **Endocrinology**, v.111, n.2, p.462-468, 1982.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, supl.1, p.25-35, 2009.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology**, v.217, n.2, p.318-324, 2009.

CASAGRANDE, L.; CORDEIRO, M.M.; NÖR, S.A.; NÖR, J.E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v.99, n.1, p.1-7, 2011.

CHEAH, K.S.E.; LAU, E.T.; AU, P.K.C.; TAM, P.P.L. Expression of the mouse $\alpha 1(\text{II})$ collagen gene is not restricted to cartilage during development. **Development**, v.111, n.4, p.945-953, 1991.

CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, n.5, p.815-820, 2008.

CHENG, Y.; CHENG, P.; XUE, F.; WU, K.M.; JIANG, M.J.; JI, J.F.; HANG, C.H.; WANG, Q.P. Repair of ear cartilage defects with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells in rabbits. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v.70, n.2, p.1137-1143, 2014.

CHEUNG, J.O.; GRANT, M.E.; JONES, C.J.; HOYLAND, J.A.; FREEMONT, A.J.; HILLARBY, M.C. Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification. **The Journal of Pathology**, v.201, n.3, p.496-503, 2003.

CHOPRA, I. J. A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T₄) to 3, 3', 5-triiodothyronine (T₃) in vitro. **Endocrinology**, v. 101, n. 2, p. 453-463, 1977.

COLEMAN, R.M.; CASE, N.D.; GULDBERG, R.E. Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors. **Biomaterials**, v.28, n.12, p.2077-2086, 2007.

COLES, B.L.K.; ANGÉNIEUX, B.; INOUE, T.; DEL RIO-TSONIS, K.; SPENCE, J.R.; MCLNNES, R.R.; ARSENIJEVIC, Y.; VAN DER KOOY, D. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.44, p.15772-15777, 2004.

COOKE, M.E.; ALLON, A.A.; CHENG, T.; KUO, A.C.; KIM, H.T.; VAIL, T.P.; MARCUCIO, R.S.; SCHNEIDER, R.A.; LOTZ, J.C.; ALLISTON, T. Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.19, n.10, p.1210-1218, 2011.

CRAIG, W.; POPPEMA, S.; LITTLE, M.T.; DRAGOWSKA, W.; LANSDORP, P.M. CD45 isoform expression on human haemopoietic cells at different stages of development. **British Journal of Haematology**, v.88, n.1, p.24-30, 1994.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, v.128, n.6, p.507-520, 2007.

DANISOVIC, L.; VARGA, I.; POLÁKI, S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Tissue and Cell**, v.44, n.2, p.69-73, 2012.
DE CROMBRUGGHE, B; LEFEBVRE, V.; BEHRINGER, R.R.; BI, W.; MURAKAMI, S.; HUANG, W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. **Matrix Biology**, v.19, n.5, p.389-394, 2000.

DE CROMBRUGGHE, B; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, n.6, p.721-727, 2001.

DELISE, A.M.; TUAN, R.S. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. **Developmental Dynamics**, v.225, n.2, p.195-204, 2002.
DERFOUL, A.; PERKINS, G.L.; HALL, D.J.; TUAN, R.S. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. **Stem Cells**, v.24, n.6, p.1487-1495, 2006.

DI MAGGIO, N.; MEHRKENS, A.; PAPADIMITROPOULOS, A.; SCHAEREN, S.; HEBERER, M.; BANFI, A.; MARTIN, I. Fibroblast growth factor-2 maintains a niche-dependent population of self-renewing highly potent nonadherent mesenchymal progenitors through FGFR2c. **Stem Cells**, v.30, n.7, p.1455-1464, 2012.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stem cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

ENOMOTO, H.; FURUICHI, T.; ZANMA, A.; YAMANA, K.; YOSHIDA, C.; SUMITANI, S.; YAMAMOTO, H.; ENOMOTO-IWAMOTO, M.; IWAMOTO, M.; KOMORI, T. Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. **Journal of Cell Science**, v.117, n.3, p.417-425, 2004.

ERLEBACHER, A.; FILVAROFF, E.H.; GITELMAN, S.E.; DERYNCK, R. Toward a molecular understanding of skeletal development. **Cell**, v.80, n.3, p.371-378, 1995.

FERNÁNDEZ-PERNAS, P.; FAFIÁN-LABORA, J.; LESENDE-RODRIGUEZ, I.; MATEOS, J.; DE LA FUENTE, A.; FUENTES, I.; DE TORO SANTOS, J.; BLANCO GARCÍA, F.; ARUFE, M.C. 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine increases in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells from human umbilical cord stroma through SRC2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.117, n.9, p.2097-108, 2016.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinetics**, v.3, n.4, p.393-403, 1970.

FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA, J.F.; KULAGINA, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v.4, n.5, p.267-274, 1976.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v.6, n.2, p.230-247, 1968.

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v.287, n.5457, p.1433-1438, 2000.

GANG, E.J.; BOSNAKOVSKI, D.; FIGUEIREDO, C.A.; VISSER, J.W.; PERLINGEIRO, R.C. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. **Blood**, v.109, n.4, p.1743-1751, 2007.

GARTNER, L. **Tratado de Histologia**. 3ª edição, Rio de Janeiro. Elsevier Brasil, 2011. 1943p.

GREENSPAN, S. L.; RESNICK, N. M. Geriatric Endocrinology In: Greenspan FS, Strewler GJ, eds. Basic and clinical endocrinology 7th ed. Stamford Appleton and Lange, 1997.

GRONTHOS, S.; ARTHUR, A.; BARTOLD, P.M.; SHI, S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v.698, p.107-121, 2011.

GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A.C.; HAY, S.J.; SHI, S.; GRAVES, S.E.; KORTESIDIS, A.; SIMMONS, P.J. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**, v.116, n.9, p.1827-1835, 2003.

GRUBER, R.; CZERWENKA, K.; WOLF, F.; HO, G.M.; WILLHEIM, M.; PETERLIK, M. Expression of the vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor α - and β -isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. **Bone**, v.24, n.5, p.465-473, 1999.

HARA, E.S.; ONO, M.; YOSHIOKA, Y.; UEDA, J.; HAZEHARA, Y.; PHAM, H. T.; MATSUMOTO, T.; KUDOKI, T. Antagonistic effects of insulin and TGF- β 3 during chondrogenic differentiation of human BMSCs under a minimal amount of factors. **Cells Tissues Organs**, v.201, n.2, p.88-96, 2016.

HOCH, A.I.; LEACH, J.K. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. **Stem Cells Translational Medicine**, v.3, n.5, p.643-652, 2014.

HUANG, W.; ZHOU, X.; LEFEBVRE, V.; DE CROMBRUGGHE, B. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, n.11, p.4149-4158, 2000.

ISHII, M.; KOIKE, C.; IGARASHI, A.; YAMANAKA, K.; PAN, H.; HIGASHI, Y.; KAWAGUCHI, H.; SUGIYAMA, M.; KAMATA, N.; IWATA, T.; MATSUBARA, T.; NAKAMURA, K.; KURIHARA, H.; TSUJI, K.; KATO, Y. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.332, n.1, p.297-303, 2005a.

ISHII, G.; SANGAI, T.; SUGIYAMA, K.; ITO, T.; HASEBE, T.; ENDOH, Y.; MAGAE, J.; OCHIAi, A. In vivo characterization of bone marrow derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. **Stem Cells**, v.23, n.5, p.699-706, 2005b.

JACKSON, L.; JONES, D.R.; SCOTTING, P.; SOTTLILE, V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.53, n.2, p.121-127, 2007.

JAGIELSKI, M.; WOLF, J.; MARZAHN, U.; VOLKER, A.; LEMKE, M.; MEIER, C.; ERTEL, W.; GODKIN, O.; ARENS, S.; SCHULZE-TANZIL, G. The influence of IL-10 and TNF α on chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional cultures. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.9, p.15821-1544, 2014.

JAVAZON, E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v.32, n.5, p.414-425, 2004.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R.E.; KEENE, C.D.; ORTIZ-GONZALES, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISGERG, A.; LOW, W.C.; LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v.418, n.6893, p.41-49, 2002.

JONES, E.A.; ENGLISH, A.; KINSEY, S.E.; STRASZYNSKI, L.; EMERY, P.; PONCHEL, F.; MCGONAGLE, D. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v.70, n.6, p.391-399, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a edição, Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KANAWA, M.; IGARASHI, A.; RONALD, V. S.; HIGASHI, Y.; KURIHARA, H.; SUGIYAMA, M.; SASKIANTI, T.; PAN, H.; KATO, Y. Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2. **Cytotherapy**, v.15, n.9, p.1062-1072, 2013.

KARAPLIS, A.C.; LUZ, A.; GLOWACKI, J.; BRONSON, R.T.; TYBULEWICZ, V.L.; KRONENBERG, H.M.; MULLIGAN, R.C. Lethal skeletal dysplasia from targeted

disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. **Genes & development**, v.8, n.3, p.277-289, 1994

KARL, A.; OLBRICH, N.; PFEIFER, C.; BERNER, A.; ZELLNER, J.; KUJAT, R.; ANGELE, P.; NERLICH, M.; MUELLER, M.B. Thyroid hormone-induced hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis is mediated by bone morphogenetic protein-4. **Tissue Engineering Part A**, v.20, n.1-2, p.178-188, 2014.

KOCH, M.; MURRELL, J.R.; HUNTER, D.D.; OLSON, P.F.; JIN, W.; KEENE, D.R. A novel member of the netrin family, -netrin, shares homology with the chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. **The Journal of Cell Biology**, v.34, n.151, p.221-234, 2000.

KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 151, n. 1, p. 103-119, 1999.

KOLF, C.M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v.9, n.1, p.204, 2007.

KRATCHMAROVA, I.; BLAGOEV, B.; HAACK-SØRENSEN, M.; KASSEM, M.; MANN, M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. **Science**, v.308, n.5727, p.1472-1477, 2005

KRETLOW, J.D.; JIN, Y.Q.; LIU, W.; ZHANG, W.J.; HONG, T.H.; ZHOU, G.; SCOTT BAGGETT, L.; MIKOS, A.G.; CAO, Y. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. **BMC Cell Biology**, v.9, n.1, p.60, 2008.

KURODA, R.; ISHIDA, K.; MATSUMOTO, T.; AKISUE, T.; FUJIOKA, H.; MIZUNO, K.; OHGUSHI, H.; WAKITANI, S.; KUROSAKA, M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.15, n.2, p.226-231, 2007.

LAINO, G.; D'AQUINO, R.; GRAZIANO, A.; LANZA, V.; CARINCI, F.; NARO, F.; PIROZZI, G.; PAPACCIO, G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). **Journal of Bone and Mineral Research**, v.20, n.8, p.1394-1402, 2005.

LARSSON, T.; SOMMARIN, Y.; PAULSSON, M.; ANTONSSON, P. HEDBOM, E.; WENDEL, M.; HEINEGÅRD, D. Cartilage matrix proteins. A basic 36-kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.30, p.20428-20433, 1991.

LEE, C.R.; GRODZINSKY, A.J.; HSU, H.P.; MARTIN, S.D.; SPECTOR, M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. **Journal of Orthopaedic Research**, v.18, n.5, p.790-799, 2000.

LEFEBVRE, V.; BEHRINGER, R.R.; DE CROMBRUGGHE, B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.9, suppl.A, p.S69-S75, 2001.

LEFEBVRE, V.; BHATTARAM, P. SOXC genes and the control of skeletogenesis. **Current Osteoporosis Reports**, v.14, n.1, p.32-38, 2016.

LEFEBVRE, V.; BHATTARAM, P. Vertebrate skeletogenesis. **Current Topics in Developmental Biology**, v.90, p.291-317, 2010.

LEFEBVRE, V.; DE CROMBRUGGHE, B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. **Matrix Biology**, v.16, n.9, p.529-540, 1998.

LEMISCHKA, I.R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1044, n.1, p.132-138, 2005.

LIN, H.T.; OTSU, M.; NAKAUCHI, H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.368, n.1609, p.20110334, 2013.

LIU, L.; CHEUNG, T.H.; CHARVILLE, G.W.; RANDO, T.A. Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting **Nature Protocols**, v.10, n.10, p.1612-1624, 2015.

LIU, S.; ZHANG, E.; YANG, M.; LU, L. Overexpression of Wnt11 promotes chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in synergism with TGF- β . **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.390, n.1-2, p.123-131, 2014.

LIU, T.M.; GUO, X.M.; TAN, H.S.; HUI, J.H.; LIM, B.; LEE, E.H. Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. **Arthritis and Rheumatism**, v.63, n.9, p.2711-2720, 2011.

LIU, T.M.; MARTINA, M.; HUTMACHER, D.W.; HUI, J.H.; LEE, E.H.; LIM, B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **Stem Cells**, v.25, n.3, p.750-760, 2007.

LIU, Z. J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O. C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.106, n.6, p.984-991, 2009.

LONGOBARDI, L.; O'REAR, L.; AAKULA, S.; JOHNSTONE, B.; SHIMER, K.; CHYTIL, A.; HORTON, W.A.; MOSES, H.L.; SPAGNOLI, A. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.21, n.4, p.626-636, 2006

MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; MURPHY, J.M.; BARRY, F.P.; CHICHESTER, C.O.; PITTENGER, M.F. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. **Tissue Engineering**, v.4, n.4, p.415-428, 1998.

MACKIE, E.J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. **Journal of Endocrinology**, v.211, n.2, p.109-121, 2011.

MARKWAY, B.D.; TAN, G-K.; BROOKE, G.; HUDSON, J.E.; COOPER-WHITE, J.J.; DORAN, M. R. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. **Cell Transplantation**, v.19, n.1, p.29-42, 2010.

MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J.B.; FLOYD, Z.E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J.P.; STORMS, R.W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J.M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. **Stem Cells**, v.24, n., p.1246-53, 2006.

MEHLHORN, A.T.; NIEMEYER, P.; KAISER, S.; FINKENZELLER, G.; STARK, G.B.; S6UDKAMP, N.P.; SCHMAL, H. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. **Tissue Engineering**, v.12, n.10, p.2853-2862, 2006.

MENG, X.; ICHIM, T.E.; ZHONG, J.; ROGERS, A.; YIN, Z.; JACKSON, J.; WANG, H.; GE, W.; BOGIN, V.; CHAN, K.W.; THEBAUD, B.; RIODAN, N.H. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. **Journal of Translational Medicine**, v.5, p.57, 2007.

MILJKOVIC, N.D.; COOPER, G.M.; MARRA, K.G. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.16, n.10, p.1121-1130, 2008.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.8, p.881-887, 2000.

MIURA, M.; TANAKA, K.; KOMATSU, Y.; SUDA, M.; YASODA, A.; SAKUMA, Y.; OZASA, A.; NAKAO, K. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 Cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.17, n.3, p.443-454, 2002.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriología clínica**. 8ª edição, Rio de Janeiro. Elsevier Brasil, 2008.

MUELLER, M.B.; TUAN, R.S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. **Arthritis and Rheumatology**, v.58, n.5, p.1377-1388, 2008.

MUNDLOS, S.; OLSEN, B.R. Heritable diseases of the skeleton. Part I: molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. **The FASEB Journal**, v.11, n.2, p.125-132, 1997a.

MUNDLOS, S.; OLSEN, B.R. Heritable diseases of the skeleton. Part II: molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. **The FASEB Journal**, v.11, n.4, p.227-233, 1997b.

MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science**, v.113, n.7, p.1161-1166, 2000.

MURAKAMI, S.; KAN, M.; MCKEEHAN, W.L.; DE CROMBRUGGHE, B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.3, p.1113-1118, 2000.

MURTAUGH, L.C.; CHYUNG, J.H.; LASSAR, A.B. Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. **Genes and Development**, v.13, n.2, p.225-237, 1999.

NARAKORNSAK, S.; POOVACHIRANON, N.; PEERAPAPONG, L.; POTHACHAROEN, P.; AUNGSUCHAWAN, S. Mesenchymal stem cells differentiated into chondrocyte-Like cells. **Acta Histochemica**, v.118, n.4, p.418-429, 2016.

NEJADNIK, H.; HUI, J.H.; CHOONG, E.P.F.; TAI, B.C.; LEE, E.H. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: An observational cohort study. **The American Journal of Sports Medicine**, v.38, n.6, p.1110-1116, 2010.

NESIC, D.; WHITESIDE, R.; BRITTBERG, M.; WENDT, D.; MARTIN, I.; MAINIL-VARLET, P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n.2, p.300-322, 2006.

NG, L.J.; WHEATLEY, S.; MUSCAT, G.E.; CONWAY-CAMPBELL, J.; BOWLES, J.; WRIGHT, E.; BELL, D.M.; TAM, P.P.; CHEAH, K.S.; KOOPMAN, P. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, v.183, n.1, p.108-121, 1997.

NUNES, M. T. Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, 2003.

OBREGON, M.; DEL REY, F. E.; DE ESCOBAR, G. M. The effects of iodine deficiency on thyroid hormone deiodination. **Thyroid**, v. 15, n. 8, p. 917-929, 2005.

OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; GOES, A.M.; SILVA, J.F.; MARUBAYASHI, U.; SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from

osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide**, v.19, n.4, p.320-325, 2008.

OKAMOTO, T.; AOYAMA, T.; NAKAYAMA, T.; NAKAMATA, T.; HOSAKA, T.; NISHIJO, K.; NAKAMURA, T.; KIYONO, T.; TOGUCHIDA, J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.295, n.2, p.354-361, 2002.

OKUBO, Y.; REDDI, A.H. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.306, n.1, p.186-190, 2003.

PARK, J.S.; SHIM, M.S.; SHIM, S.H.; YANG, H.N.; JEON, S.Y.; WOO, D.G.; LEE, D.R.; YOON, T.K.; PARK, K.H. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- β 3. **Biomaterials**, v.32, n.32 p.8139-8149, 2011.

PARK, K.H.; NA, K. Effect of growth factors on chondrogenic differentiation of rabbit mesenchymal cells embedded in injectable hydrogels. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.106, n.1, p.74-79, 2008.

PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. **Cell Biology**, v.33, n.1, p.2-18, 2006.

PILLING, D.; FAN, T.; HUANG, D.; KAUL, B.; GOMER, R.H. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. **PLoS One**, v.4, n.10, p.e7475, 2009.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.

PRADO, A.A.F.; FAVARON, P.O.; DA SILVA, L.C.L.C.; BACCARIN, R.Y.A.; MIGLINO, M.A.; MARIA, D.A. Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. **BMC Veterinary Research**, v.11, n.1, p.1, 2015.

PUETZER, J.L.; PETITTE, J.N.; LOBOA, E.G. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. **Tissue Engineering Part B**, v.16, n.4, p.435-444, 2010.

RANDAU, T.M.; SCHILDBERG, F.A.; ALINI, M.; WIMMER, M.D.; HADDOUTI, EI-M.; GRAVIUS, S.; ITO, K.; STODDART, M.J. The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells. **Plos One**, v.8, n.8, p.72973, 2013.

RANGANATH, S.H.; LEVY, O.; INAMDAR, M.S.; KARP, J.M. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. **Cell Stem Cell**, v.10, n.3, p.244-258, 2012.

RASTEGAR, F.; SHENAG, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.Q.; HE, B.C.; CHEN, L.; ZUO, G.W.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, E.R.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J.L.; KIM, S.H.; ZHOU, J.Z.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R.R.; LUU, H.H.; HAYDON, R.C.; DENG, Z.L.; HE, T.C. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. **World Journal of Stem Cells**, v.2, n.4, p.67-80, 2010.

RINGE, J.; LEINHASE, I.; STICH, S.; LOCH, A.; NEUMANN, K.; HAISCH, A.; HAUPL, T.; MANZ, R.; KAPS, C.; SITTINGER, M. Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.2, n.2-3, p.136-146, 2008.

ROARK, E.F.; GREER, K. Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. **Developmental dynamics**, v.200, n.2, p.103-116, 1994.

ROBSON, H.; SIEBLER, T.; STEVENS, D.A.; SHALET, S.M.; WILLIAMS, G.R. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. **Endocrinology**, v.141, n.10, p.3887-3897, 2000.

ROEBUCK, K.A.; FINNEGAN, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. **Journal of Leukocyte Biology**, v.66, n.6, p.876-888, 1999.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998. 211p.

SCHAFER, R.; KNAUF, U.; ZWEYER, M.; HOGEMEIER, O.; DE GUARRINI, F.; LIU, X.; EICHHORN, H.J.; KOCH, F.W.; MUNDEGAR, R.R.; ERZEN, I.; WERNIG, A. Age dependence of the human skeletal muscle stem cell in forming muscle tissue. **Artificial Organs**, v.30, n.3, p.130-140, 2006.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells- basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**, v.25, n.4, p.818-827, 2007.

SCHARSTUHL, A.; SCHEWE, B.; BENZ, K.; GAISSMAIER, C.; BÜHRING, H.-J.; STOOP, R. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. **Stem Cells**, v.25, n.12, p.3244-3251, 2007.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v.84, n.11, p.901-910, 2006.

SCHMITT, B.; RINGE, J.; HAUPL, T.; NOTTER, M.; MANZ, R.; BURMESTER, G.R.; SITTINGER, M.; KAPS, C. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. **Differentiation**, v.71, n.9-10, p.567-577, 2003.

SCHWINDT T.T.; BARNABÉ G.F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v.16, n.1, p.13-19, 2005.

SEKIYA, I.; COLTER, D.C.; PROCKOP, D.J. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.284, n.2, p.411-418, 2001.

SEKIYA, I.; LARSON, B.L.; VUORISTO, J.T.; REGER, R.L.; PROCKOP, D.J. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. **Cell and Tissue Research**, v.320, n.2, p.269-276, 2005.

SELLHEYER, K.; KRAHL, D. Cutaneous mesenchymal stem cells: status of current knowledge, implications for dermatopathology. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.37, n.6, p.624-634, 2010.

SEMBA, I.; NONAKA, K.; TAKAHASHI, I.; TAKAHASHI, I.K.; DASHNER, R.; SHUM, L.; NUCKOLLS, G.H.; SLAVKIN, H.C. Positionally-dependent chondrogenesis induced by BMP4 is co-regulated by Sox9 and Msx2. **Developmental Dynamics**, v.17, n.4, p.401-414, 2000.

SHEN, B.; WEI, A.; TAO, H.; DIWAN, A.D.; MA, D.D.F. BMP-2 enhances TGF- β 3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. **Tissue Engineering Part A**, v.15, n.6, p.1311-1320, 2009.

SHEN, B.; WEI, A.; WHITTAKER, S.; WILLIAMS, L.A.; TAO, H.; MA, D.D.F.; DIWAN, A.D. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.109, n.2, p.406-416, 2010.

SHENFIELD, F.; PENNINGS, G.; SUREAU, C.; COHEN, J.; DEVROEY, P.; TARLATZIS, B. Stem cells. **Human Reproduction**, v.17, n.5, p.1409-1410, 2002.
SIDIQI, A.; PARSONS, M.P.; LEWIS, J.L.; MONSON, J.P.; WILLIAMS, G.R.; BURRIN, J.M. TR expression and function in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.87, n.2, p.906-914, 2002.

SIEBLER, T.; ROBSON, H.; SHALET, S.M.; WILLIAMS, G.R. Dexamethasone inhibits and thyroid hormone promotes differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells. **Bone**, v.31, n.4, p.457-464, 2002.

SIMMONS, P.J.; TOROK-STORB, B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. **Blood**, v.78, n.1, p.55-62, 1991.

SOLCHAGA, L.A.; PENICK, K.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I.; WELTER, J.F. Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Proliferation and Delays Loss of Chondrogenic Potential in Human Adult Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering Part A**, v.16, n.3, p.1009-1019, 2009.

SOLCHAGA, L.A.; PENICK, K.; PORTER, J.D.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I.; WELTER, J.F. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.203, n.2, p.398-409, 2005.

SOLCHAGA, L.A.; PENICK, K.; WELTER, J.F. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. **Methods in Molecular Biology**, v.698, p.253-278, 2011.

SOTIROPOULOU, P.A.; PEREZ, S.A.; SALAGIANNI, M.; BAXEVANIS, C.N.; PAPAMICHAIL, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v.24, n.2, p.462-471, 2006.

SOTTILE, V.; HALLEUX, C.; BASSILANA, F.; KELLER, H.; SEUWEN, K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. **Bone**, v.30, n.5, p.699-704, 2002.

STEWART, K.; MONK, P.; WALSH, S.; JEFFERISS, C.M.; LETCHFORD, J.; BERESFORD, J.N. STRO1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: A comparative investigation in vitro. **Cell and Tissue Research**, v.313, n.3, p.281-290, 2003.

STUDER, D.; MILLAN, C.; ÖZTÜRK, E.; MANIURA-WEBER, K.; ZENOBI-WONG, M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. **European Cells & Materials**, v.24, n.24, p.118-135, 2012.

SUVA, D.; GARAVAGLIA, G.; MENETREY, J.; CHAPUIS, B.; HOFFMEYER, P.; BERNHEIM, L.; KINDLER, V. Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.198, n.1, p.110-118, 2004.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v.131, n.5, p.861-872, 2007.

TAMAMA, K.; KAWASAKI, H.; WELLS, A. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC BioMed. **Research International**, v. 2010, p.795385, 2010.

TANG, Y.; WANG, B. Gene and stem cell-based therapeutics for cartilage regeneration and repair. **Stem Cell Research & Therapy**, v.15, n.6, p.78, 2015.

THORPE, S.D.; BUCKLEY, C.T.; VINARDELL, T.; O'BRIEN, F.J.; CAMPBELL, V.A.; KELLY, D.J. The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to dynamic compression following TGF- β 3 induced chondrogenic differentiation. **Annals of Biomedical Engineering**, v.38, n.9, p.2896-2909, 2010.

TOMINAGA, H.; MAEDA, S.; MIYOSHI, H.; MIYAZONO, K.; KOMIYA, S.; IMAMURA, T. Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.27, n.1, p.36-45, 2009.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B.H. **Principles of Anatomy and Physiology**. 13^a edição, Toronto: John Wiley & Sons, 2008.

UCHIDA, N.; BUCK, D.W.; HE, D.; REITSMA, M.J.; MASEK, M.; PHAN, T.V.; TSUKAMOTO, A.S.; GAGE, F.H.; WEISSMAN, I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.26, p.14720-14725, 2000.

VAITKUS, J. A.; FARRAR, J. S.; CELI, F. S. Thyroid hormone mediated modulation of energy expenditure. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.7, p.16158-16175, 2015.

VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Acta Biomaterialia**, v.7, n.2, p.463-477, 2011.

VORTKAMP, A.; LEE, K.; LANSKE, B.; SEGRE, G.V.; KRONENBERG, H.M.; TABIN, C.J. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. **Science**, v.273, n.5275, p.613, 1996

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v.116, n.5, p.639-648, 2004.

WAKITANI, S.; NAWATA, M.; TENSCHO, K.; OKABE, T.; MACHIDA, H.; OHGUSHI, H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.1, n.1, p.74-79, 2007.

WAKITANI, S.; OKABE, T.; HORIBE, S.; MITSUOKA, T.; SAITO, M.; KOYAMA, T.; NAWATA, M.; TENSCHO, K.; KATO, H.; UEMATSU, K.; KURODA, R.; KUROSAKA, M.; YOSHIYA, S.; HATTORI, K.; OHGUSHI, H. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed up to 11 years and 5 months. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.5, n.2, p.146-150, 2011.

WANG, Z.H.; LI, X.L.; HE, X.J.; WU, B.J.; XU, M.; CHANG, H.M.; ZHANG, X.H.; XING, Z.; JING, X.H.; KONG, D.M.; KOU, X.H.; YANG, Y.Y. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived

mesenchymal stem cells in an in vitro model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.47, n.4, p.279-86, 2014.

WATANABE, H.; YAMADA, Y. Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. **Nature genetics**, v.21, n.2, p.225-229, 1999.

WRIGHT, E.; HARGRAVE, M.R.; CHRISTIANSEN, J.; COOPER, L.; KUN, J.; EVANS, T.; GANGADHARAN, U.; GREENFIELD, A.; KOOPMAN, P. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. **Nature genetics**, v.9, n.1, p.15-20, 1995.

YAYLACI SU, SEN M, BULUT O, ARSLAN E, GULER MO, TEKINAY AB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on glycosaminoglycan-mimetic peptide nanofibers. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v.2, n.5, p.871-878, 2016.

YOKOYAMA, M.; MIWA, H.; MAEDA, S.; WAKITANI, S.; TAKAGI, M. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.106, n.1, p.46-50, 2008.

ZEHENTNER, B.K.; DONY, C.; BURTSCHER, H. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, n.10, p.1734-1741, 1999.

ZHANG, W.; OU, G.; HAMRICK, M.; HILL, W.; BORKE, J.; WENGER, K.; CHUTKAN, N.; YU, J.; MI, Q.; ISALES, C.M.; SHI, X.M. Age-related changes in the osteogenic differentiation potential of mouse bone marrow stromal cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.23, n.7, p.1118-1128, 2008.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, Z. The effect of non-growth factors on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Cell and Tissue Banking**, v.15, n.3, p.319-327, 2014.

ZHANG, Y.; KUMAGAI, K.; SAITO, T. Effect of parathyroid hormone on early chondrogenic differentiation from mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.9, n.1, p.68-74, 2014.

ZHAO, Q.; EBERSPAECHER, H.; LEFEBVRE, V.; DE CROMBRUGGHE, B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. **Developmental Dynamics**, v.209, n.4, p.377-386, 1997.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, n.12, p.4279-4295, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE. Protocolo (número 062/2013) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo.

